

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>A61K 39/35 // C07K 14/725</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO97/32600</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1997年9月12日(12.09.97)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP97/00740 <b>(22) 国際出願日</b> 1997年3月10日(10.03.97) <b>(30) 優先権データ</b> 特願平8/80702 1996年3月10日(10.03.96) JP <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 明治乳業株式会社(MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋2丁目3番6号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 曾根敏雄(SONE, Toshio)(JP/JP) 桑 晃智(KUME, Akinori)(JP/JP) 大力一雄(DAIRIKI, Kazuo)(JP/JP) 岩間亜希子(IWAMA, Akiko)(JP/JP) 紀 光助(KINO, Kohsuke)(JP/JP) 〒250 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社 ヘルスサイエンス研究所内 Kanagawa, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 清水初志(SHIMIZU, Hatsushi) 〒300 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		<b>(81) 指定国</b> CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書
<b>(54) Title: PEPTIDE-BASE IMMUNOTHERAPEUTIC AGENT FOR ALLERGIC DISEASES</b> <b>(54) 発明の名称</b> アレルギー疾患に対するペプチド免疫療法剤  <b>(57) Abstract</b> A peptide-base immunotherapeutic agent containing an efficacious amount of a monomolecular multi-epitope peptide prepared by bonding T-cell epitope regions derived from different allergen molecules with each other. It is efficacious for the prevention and therapy of a wide variety of allergic diseases.		

(57) 要約

本発明は、異なるアレルゲン分子由来のT細胞エпитープ領域をつなぎ合わせた1分子の多重エピトープペプチドを提供するものである。この多重エピトープの有効量を含有するペプチド免疫療法剤は、広範囲のアレルギー疾患の予防及び治療に有効である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	EF	スペイン	LS	レソト	RD	ロース
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GN	ギニア	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GU	グアム	MG	マダガスカル	SS	スワジランド
BJ	ベナン	HN	ホンジュラス	MK	マケドニア	TD	チュニジア
BR	ブラジル	IE	アイルランド	VI	ヴァチカン共和国	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モロッコ	TR	トルコ
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボワール	KR	大韓民国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	LI	リベリア	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	LK	スリランカ	PL	ポーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ			PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

## 明細書

## アレルギー疾患に対するペプチド免疫療法剤

技術分野

本発明は、アレルギー疾患に対するペプチド免疫療法に有効な多重エпитープペプチドに関する。

背景技術

アレルギー疾患は、I型過敏症(hypersensitivity)免疫反応、すなわち、IgE抗体を介したI型免疫反応が基盤となって生じた機能障害、あるいは障害による疾患群と定義される。その病態は、花粉症、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アナフィラキシーショックなどである。花粉症は、アレルギー疾患の代表的疾患であり、我が国では、約10%の人達がスギ花粉症に苦しめられているが、なお、その数は増加の一途をたどっている。米国では、ブタクサ花粉症の患者が5~15%いると推測されている。このように花粉症は、その患者数が多いこと、眼のかゆみ、鼻水、くしゃみ、鼻づまり等のつらい症状を伴うこと、一度発病すると毎年繰り返すこと等から社会的、経済的にも大きな問題であり、根本的治療法の開発が切望されている。

I型アレルギー反応の成立に関する研究は、アレルギー疾患の理解と治療にあたって重要である。現在、アレルゲン特異的免疫反応における初期の反応、特に、T細胞によるアレルギー反応制御のメカニズムの解明に焦点が当てられている。アレルゲンを含む外来抗原に対する免疫反応の開始は、免疫システムの抗原提示細胞に依存する。B細胞、マクロファージ、および樹状細胞を含む抗原提示細胞は、外来抗原を取り込み、抗原ペプチド(T細胞エпитープペプチド)まで断片化してMHCクラスII分子(ヒトではHLAクラスII)の $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖で形成され

るポケットに収容し、細胞表面に表現し、抗原特異的CD4陽性ヘルパーT細胞(Th細胞)に抗原提示する。HLAクラスII分子はDR、DQおよびDP分子からなり、DR分子の $\alpha$ 鎖はHLA-DRA、 $\beta$ 鎖はHLA-DRB1、-DRB3、-DRB4または-DRB5遺伝子によりコードされ、DQ分子の $\alpha$ 鎖は、HLA-DQA1、 $\beta$ 鎖はHLA-DQB1遺伝子によりコードされ、DP分子の $\alpha$ 鎖はHLA-DPA1、 $\beta$ 鎖はHLA-DPB1遺伝子によってコードされている。HLA-DRAを除く各々の遺伝子は多くの対立遺伝子を含み、抗原ペプチドを収容するポケットは高度の多型性を示し、その構造が微妙に異なる。その結果、ポケットに結合しT細胞に提示される抗原ペプチドの種類はおのずとその構造に制限される。

HLAクラスII拘束性の抗原情報をT細胞レセプター(TCR)を介して受け取ったTh細胞は、活性化し、種々のサイトカインを分泌することにより自ら増殖するとともに、B細胞を形質細胞に分化させ、抗体産生を誘導する。抗原刺激によって活性化されたTh細胞は、サイトカインの産生パターンの相違によってインターロイキン2(IL-2)、インターロイキン $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、リンホトキシン(TNF- $\beta$ )を産生するTh1細胞、IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13を産生するTh2細胞、両方のサイトカインを産生するTh0細胞、に分類される。アレルギーの原因となるIgE抗体の産生は、IL-4、IL-13によって促進されるが、IFN- $\gamma$ によって抑制される。すなわち、Th1細胞はIgEの産生を抑制し、Th2細胞はそれを促進する。抗原の侵入に際し、Th1細胞が働くかTh2細胞が働くかでアレルギーの感作が生じるか否かが定まるともいえる。実際、アレルギー患者ではTh2細胞が優位に働いていることが知られている。アレルギー特異的IgE抗体は、末梢血中の好塩基球および組織のマスト細胞に固着し、引き続くアレルギーの侵入により、アレルギーを介してIgE抗体が好塩基球やマスト細胞上で架橋し、その結果、ヒスタミン、プロスタグランジンおよびロイコトリエンを含む炎症性メディエーターが放出され、即時性アレルギー反応が引き起こされる。これらの炎症性メディエーターに応答して、局所に集積したリンパ

球、単球、好塩基球、および好酸球が活性化され、組織に障害を含む様々な反応をもたらすメディエーターを遊離することにより遅発アレルギー反応が引き起こされる。

抗原特異的に I g E 抗体産生を抑制することで特定のアレルギーを治療しようとする試みの一つに、アレルゲンタンパク分子を用いた減感作療法がある。減感作療法は、薬物療法では得ることの出来ない長期にわたる持続効果があり、唯一の根本的治療に近いにもかかわらず、かならずしも一般的な治療法として認知されていないのが現状である。その理由として、この治療法に伴う副作用（局所の腫脹やアナフィラキシーショックなど）の危険性のほかに、この治療法がどうして有効なのかその作用機序がいまだに不明である点があげられる。

そこで登場したのが T 細胞エпитープを有するペプチド抗原を用いた減感作の考え方である。この治療方法に用いられるアレルゲン分子上の T 細胞エпитープを含むペプチド断片は、B 細胞エпитープを含まない、あるいは含んでいても 1 価であり、マスト細胞の高親和性 I g E レセプターをクロスリンクできない、などの理由により、患者に投与してもアナフィラキシーなどの副作用がおこらないと考えられる。さらに、T 細胞エпитープを生体に投与すると、T 細胞が抗原特異的に不活性化（アナジー、anergy）される現象が知られている (La Salle JM, et al.: J. Exp. Med. 176: 177-186, 1992)。このような理論的背景のもとにネコの毛アレルゲン Fel d 1 の主要 T 細胞エпитープを含むペプチドを用いた減感作の動物実験が行われ、in vitro で T 細胞アナジーが誘導されることが報告されており (Briner, T. J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7608-7612, 1994)、現在このペプチドを用いた減感作の臨床試験が行われている (Norman, P. S. et al.: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 154: 1623-1628, 1996; Simons, F. E. et al.: Int. Immunol. 8: 1937-1945, 1996)。このようなアレルゲン分子上の主要 T 細胞エпитープを含むペプチドを用いた減感作療法は「Peptide-based Immunotherapy」（ペプチド免疫療法あるいはペプチド減感作療法）と呼ばれて

いる。

ペプチド免疫療法に用いるT細胞エпитープペプチドの選定基準として、重要度指数 (Positivity Index; 平均T細胞刺激係数×出現頻度) が考案されている (国際公開第94/01560号)。また、ペプチドデザインに際して患者集団におけるHLAハプロタイプの多様性をカバーすべきであるとの報告がある (Wallner, B. P. & Geftner M. L.: Allergy, 49: 302-308, 1994)。

### 発明の開示

アレルギー患者の中には異なる2種類以上のアレルゲン分子のそれぞれに特異的IgE抗体を持っている者が多い。このような患者にも有効なペプチド免疫療法剤を開発することはアレルギーの根本治療に必要である。しかしながらこれまでにこのような免疫療法剤は開発されてはおらず、上記文献にもこのような発想は示されていない。従って、本発明は、異なる2種以上のアレルゲンに感受性のアレルギー患者にも有効なペプチド免疫療法剤を提供することを課題とする。

スギ花粉主要アレルゲンには、Cry j 1 (Yasueda, H. et al.: J. Allergy Clin. Immunol. 71:77-86, 1983) 及び Cry j 2 (Taniai, M. et al.: FEBS Letter 239: 329-332, 1988; Sakaguchi, M. et al.: Allergy. 45: 309-312, 1990) があるが、スギ花粉症患者の90%以上はCry j 1とCry j 2それぞれに対する特異的なIgE抗体をもっており、残り10%弱の患者は、Cry j 1又はCry j 2のどちらか一方に対する特異的IgE抗体をもっている (Hashimoto, M. et al.: Clin. Exp. Allergy 25:848-852, 1995)。従って、本発明者らは、スギ花粉症に対するペプチド免疫療法にCry j 1のみ、或いはCry j 2のみのT細胞エпитープを用いた場合には、患者の90%に対して十分な有効性は期待できないと考え、Cry j 1のT細胞エпитープ及びCry j 2のT細胞エпитープを同一分子内に含む多重エпитープを作製した。そして、当該多重エпитープペプチドがin vitroにおいて、花粉症患者のT細胞を活性化し、かつ当該患者のIgE抗体と反応せず、マウスを用いたin vivoに

においても免疫応答を誘導することを見出し、この新規な知見から、当該多重エピトープペプチドがスギ花粉症患者に対するペプチド免疫療法剤として有効であることが判明した。

更に、本発明者らはこの考え方を進展させて、スギ花粉症の症例では、ヒノキ花粉に対しても臨床症状を発現する例が多いことから、ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1のT細胞エピトープ（特願平8-153527号）とスギ花粉アレルゲンCry j 1のT細胞エピトープとを同一分子内に含む多重エピトープを作製し、当該多重エピトープペプチドが、それぞれのT細胞エピトープには反応しないスギ花粉症患者及びヒノキ花粉症患者のT細胞を活性化することを見出した。これらの新規な知見に基づき、このような多重エピトープのデザインは、スギ花粉アレルゲン及びヒノキ花粉アレルゲンに限定されず他のさまざまなアレルゲン由来のT細胞エピトープに適用できることが判明した。

さらにまた、より多くの患者に効果が期待されるように、多重エピトープをデザインする際のT細胞エピトープの選定基準として、患者集団（民族も含めて）におけるHLAハプロタイプを調査し、母集団におけるHLAハプロタイプの出現頻度が高いHLAに結合するエピトープをなるべく選択するように配慮すると共に、各エピトープがなるべく同一のHLAクラスII分子によって抗原提示されるものではなく、異なったタイプのHLAクラスII分子によって抗原提示されるT細胞エピトープペプチドを選定することにより、さらに有効対象患者を拡大させることを明らかにした。

すなわち、本発明は、請求の範囲の各請求項に記載の発明からなる。

以下に本発明をスギ花粉、或いはヒノキ花粉に感受性の患者、またはその双方に感受性の患者に有効な多重エピトープペプチドのデザインについて説明するが、本発明はこれらのアレルゲンに感受性の患者のみに限定されない。例えば、すでに一次構造が明らかにされている他のアレルゲン、例えば、ブタクサ（Amb a 1, Amb a 2, Amb a 5, Amb t 5, Amb p 5）、カモガヤ（Dac g 2）、ホソム

ギ (Lol p 1, Lol p 2, Lol p 3) などの草木花粉、ハンノキ (Al n g 1)、カバ (Bet v 1, Bet v 2)、マウンテンセダー (J u n s 1)、エンビツビャクシン (J u n v 1) などの樹木花粉、或いはその他ここに記載しないさまざまなアレルゲンにも本発明の技術思想は適用され得る。

本明細書において、「多重エпитープペプチド」とは、異なるアレルゲン分子由来のT細胞エпитープが含まれているペプチド（抗原ペプチド又は単にペプチドともいう）を直鎖状に連結して1分子としたペプチドを意味する。また、T細胞エпитープを含むペプチド領域の間に、新たに認識されるエпитープ部位が生じる可能性を減少させるために、生体内で切断される領域を介在させることが好ましい。結果として、該切断領域で多重エпитープペプチドが個々の抗原ペプチドに切断されるので、個別の抗原ペプチドを混合物として投与した場合と同等の効果が期待される。なお、該切断領域は、生体内で切断を受ける限りはいかなる構造でもよいが、ライソゾームに含まれる酵素であるカテプシンBの認識配列であるアルギニンダイマーまたはリシンダイマーを用いることができる。

本発明の多重エпитープペプチドデザインについて、スギ花粉アレルゲンCry j 1およびCry j 2を例として説明する。

スギ花粉症患者末梢血リンパ球をCry j 1またはCry j 2で刺激し、患者ごとのT細胞ラインを作製する。Cry j 1(国際公開第94/01560号)またはCry j 2(Komiya ma, N. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 201: 1201, 1994)の全一次構造をカバーする15アミノ酸程度のオーバーラッピングペプチドでT細胞ラインを刺激することにより、Cry j 1またはCry j 2分子上でT細胞エпитープとして認識されるアミノ酸配列を同定する(図1、図2)。

次に、これら抗原ペプチドと結合するHLAクラスII分子をタイピングする。

ヒトの場合、HLAクラスII分子の遺伝子座には、DR、DQ及びDP分子が存在することが知られている。このことは、抗原を提示する抗原提示分子DR、DQ及びDPによりT細胞の分化が規定されている可能性を意味している。そのため、Cry j 1また



はCry j 2の抗原ペプチドがどの遺伝子座由来の抗原提示分子で提示されるのか、また、DR、DQ、またはDP分子を介して抗原ペプチド情報を受け取ったT細胞は、Th1またはTh2細胞のどちらに分化しやすい傾向にあるのかを患者毎に樹立したT細胞クローンを用いて決定する（図3、4）。

図3、4から、抗原ペプチドの刺激後のTh1、Th2またはTh0への分化は特定のエピトープ、特定のHLA分子の組み合わせでは規定されていないことが明らかである。すなわち、本発明の多重エピトープペプチドのデザインのためにペプチドを選定する場合には、最低限T細胞エピトープ部位を含むペプチドであれば、T細胞を刺激することができるため、抗原ペプチド選定の候補となり得る。

多重エピトープペプチドデザインのためのペプチドを選定する基準は、（1）まず重要度指数（国際公開第94/01560号）の高い順番にペプチドを選定する（但し重要度指数は約100以上のものを選定する）、（2）出現頻度の高いHLAクラスII分子を抗原提示分子としているペプチドを選定する、（3）重要度指数にあまり差がない場合、有効性を上昇させるために、異なったタイプの拘束分子で提示されるペプチドを選定することである。つまりあるアレルギー疾患に対する当該アレルゲンのT細胞エピトープを選択するとき、ある集団のアレルギー患者のHLA ハプロタイプの解析を行ない、かつその患者集団が属する母集団の当該HLAハプロタイプの遺伝子頻度の高いT細胞エピトープを選択するのが最も効果が期待される選択である。逆の言い方をすれば、このようにして選択したT細胞エピトープは他の集団では全く有効性が認められなくなる場合があることを意味している。

例えば HLA ハプロタイプのDPB1\*0501 を例にすると、あるアレルギー疾患で日本人患者がこの HLA ハプロタイプが高頻度で認められ、この HLA ハプロタイプ拘束性のT細胞エピトープを選択したとする。一方こうして選択したペプチドは北アメリカ人で同じアレルギー疾患の患者に有効性はほとんど期待されない。なぜなら、この HLA ハプロタイプは日本人集団での遺伝子頻度が39.0%と非常に高

いが、北アメリカでの白人集団で1.3%、黒人集団で0.8%と非常に低いからである。北アメリカ人から HLA-DP 拘束性の T細胞エピトープを選択するなら DPB1\*0401（北アメリカ；白人30.2%、黒人11.1%、日本人；4.8%）等を選択すべきである。さらに、抗原提示分子がDR、DQ、DPというように異なる遺伝子座レベル、または遺伝子座が同一でも異なったハプロタイプの抗原提示分子で提示されるペプチドを選定することが重要である。

この際、選定すべきエピトープ部位にシステイン残基が含まれていないことが好ましい。システイン残基がエピトープ部位に含まれていると、HLAクラスII分子に非特異的に結合する可能性があり、システイン残基を含む抗原ペプチドで免疫すると、本来は抗原ではない部位が、新たなエピトープとして認識される可能性がある。エピトープとして認識された場合には、2回目、3回目のペプチド投与により、システインを含むエピトープが認識され、副作用が現れる危険性が高くなると予測される。

以下、多重エピトープデザインの具体例を示す。図1と図2に示したCry j 1とCry j 2の重要度指数を用いると、Cry j 1におけるT細胞エピトープの重要度指数は、ペプチド番号43番のアミノ酸番号211-225（以下p211-225と表示する）（拘束分子 DPA1\*0101 - DPB1\*0501）が一番高く、ペプチド番号22番p106-120（拘束分子 DRB5\*0101）が2番目である。この2者は多重エピトープペプチドに使用する抗原ペプチドとして選定できる。また、Cry j 2における重要度指数は、ペプチド番号14番p66-80（拘束分子 DRB5\*0101）と38番p186-190（DRB4\*0101）が高く同様に抗原ペプチドとして選定できる。Cry j 2のペプチド番号38番の前に位置するペプチド番号37番p181-195は、重要度指数が280であるが拘束分子がDPA1\*0101 - DPB1\*0201であり、38番の拘束分子とは異なる。ペプチド37番p181-195はペプチド番号38番p186-200と10残基オーバーラップしており、38番の前に37番の5残基を付加し、HLA-DP分子拘束性のペプチドとして選択できる。これまで選定してきたペプチドの中にはDQ拘束性を示す抗原ペプチドは存在しない。Cry j 1のペプチド番号

4番p16-30はDQA1\*0102-DQB1\*0602が拘束分子であるが、エピトープの中央にシステイン残基が含まれるため選定できない。Cry j 2のペプチド番号69～70番に該当するp341-360はDQA1\*0102-DQB1\*0602 で提示されるペプチドであるが、これも70番のペプチドの中にはシステインが含まれている。しかし、システインを含まない69番のペプチドのみでもT細胞を活性化することができるため、12残基のみ、即ちp344-355 (ISLKLTSKIAS) を選定できる。また、Cry j 1のペプチド番号22番p106-120は107番目にシステインを含むが、T細胞クローンを使用したT細胞エピトープのコア配列の決定によって最低必要な配列はp109-117 (FIKRVSNVI) の9残基である。すなわち、p106-107番目のPro-Cys残基を除去しても使用することができる。

抗原提示細胞内に取り込まれた抗原はライソソームで分解される。抗原提示分子に外来性の蛋白質が取り込まれ、どのようにプロセスされ、またどのように HLAクラスII分子に結合するかは未だに未解決のままである。しかしながら、現在では、この複雑な機構の中で抗原の切断にカテプシンBが関与している可能性が指摘されている(勝沼信彦、日本免疫学会(1995)25:75)。

幾つかの HLAクラスIIタイプに関しては、抗原ペプチドのHLA結合性アミノ酸モチーフが決定されてきている。HLAクラスII分子に対する結合は特異性を有するが、ある特定のHLAクラスIIタイプについても一定の法則を満たすペプチドであればかなりの種類の抗原ペプチドが結合できる(Rammensee, H.-G. et al. Immunogenetics. (1995) 41:178-228)。このため、抗原ペプチドをつなげた部位に、新たに認識されるエピトープ部位が生ずる可能性がある。これを避けるため、抗原ペプチドごとに抗原提示細胞内で切断されるように多重エピトープペプチドをデザインするのが好ましい。カテプシンBが認識するペプチド配列はArg-Arg-疎水性配列またはLys-Lys-疎水性配列であるため、エピトープを含むペプチドの後半にArg-ArgまたはLys-Lysを付加し、次に続くエピトープ配列は Arg-ArgまたはLys-Lysに続いて疎水性アミノ酸配列が位置するように配置する。

この具体例の抗原ペプチドの配列の順番に関しては、抗原ペプチドの間にArg-Argを介在させたので、順番は問う必要がないと考えられるが、Cry j 2のペプチド番号14番（図2）に関しては、このペプチドの後半にArgを接続すると、73番のTyrが第一アンカーとなり、付加したArg残基がDRB5\*0101のペプチド結合モチーフの9番目のアミノ酸となって第二アンカーとなる可能性がある。その結果、新たなエпитープとして認識される可能性がある。このため、この配列は多重エпитープペプチドの最後に位置するのが好ましい。

このようにして得られた多重エпитープペプチドを、配列番号：1に示す。この多重エпитープの拘束分子は、DRB4\*0101、DRB5\*0101、DPA1\*0101-DPB1\*0201、DPA1\*0101-DPB1\*0501、DQA1\*0102-DQB1\*0602である。第11回国際組織適合抗原会議において日本人集団におけるこれらの遺伝子頻度が計算されている（Tsuji, K. et al. HLA 1991 vol. 1 (1992) Oxford University Press）。DRB4\*0101は0.291、DRB5\*0101は0.056（DRB5\*0102は0.070）、DPB1\*0201は0.208、DPB1\*0501は0.399、DQB1\*0602は0.053（DQB1\*0601は0.204）と算出されている。この値から抗原頻度を計算するとDRB4\*0101=0.50、DRB5\*0101=0.11（DRB5\*0102=0.14）、DPB1\*0201=0.37、DPB1\*0501=0.64（Hori et al.の観察では0.79）、DQB1\*0602=0.10（DQB1\*0601=0.37）と計算される。DRB5\*0101とDQB1\*0602には連鎖不平衡が存在するため同一とみなせるため、DRB5\*0101の値が使用できる。日本人集団でDPB1\*0201とDPB1\*0501の両タイプの両者または片方を所持する確率は0.85と計算される。また、DRB4\*0101とDRB5\*0101の両者または片方を所持する確率は0.56と計算される。この値から、配列番号：1の多重エпитープペプチドに含まれるT細胞エпитープを一箇所以上認識できる患者はおおよそ90%と見積もられる。しかしながら、これらのHLA-タイプを所持する患者においてもT細胞側でこれらの拘束分子で抗原情報が提示されてもこれらのエпитープペプチドを認識できるT細胞レパトリーが存在するかどうかは不明である。また、T細胞の増殖を引き起こすためのエпитープ数が未知である（2箇所以上必要である可能性がある）ため、この多重エピ

ープペプチドの有効率は下がると考えられる。実際には17名の末梢血リンパ球の増殖応答での結果つまり、77%前後が妥当な値と予測される。

さらに、有効対象人員を拡大させるために、T細胞エピトープをより多く含む多重エピトープペプチドをデザインすることもできる。例えば、Cry j 1のp213-225, p108-120, Cry j 2のp182-200, p79-98, Cry j 1のp80-95, Cry j 1のp66-80をこの順につないだ多重エピトープペプチド(配列番号: 2)、あるいは、Cry j 1のp213-225, p108-120, Cry j 2のp182-200, p79-98, Cry j 1のp67-95, Cry j 2のp238-251, p66-80をこの順につないだ多重エピトープペプチド(配列番号: 3)である。これらの多重エピトープペプチドは、調査したスギ花粉症患者21名全員の末梢血リンパ球を刺激し、患者IgE抗体と反応しないのでペプチド免疫療法剤として有効である。このような考え方をさらに進展させて、種の異なるアレルゲン例えば、ヒノキ花粉アレルゲンとスギ花粉アレルゲンのT細胞エピトープを実施例13に示す方法で作製し有効性の拡大をさらにはかることもできる。

T細胞の活性を調節するために多重エピトープペプチドに使用する抗原ペプチド部分の改変を行なうことも本発明に含まれる。改変とは1残基以上のアミノ酸置換、欠失、挿入を行なうことである。抗原ペプチドのアミノ酸置換によってT細胞に与える質的な変化を調べることは既に知られている方法で行うことができる。例えば、本発明の多重エピトープペプチド中の特定のアミノ酸を、1) 類似したアミノ酸に置換する方法で、Asp を Glu に、Asn を Gln に、Lys を Arg に、Phe を Tyr に、Ile を Leu に、Gly を Ala に、Thr を Ser に置換したアナログペプチドを合成し、T細胞の増殖能、あるいはリンホカインの産生能等をもとのペプチドと比較する、2) 類似していないアミノ酸に置換する方法で、極性アミノ酸と親水性アミノ酸は疎水性アミノ酸である Ala に、疎水性アミノ酸は親水性アミノ酸である Ser に置換し、もとのペプチドと比較する。このようにして得られたアナログペプチドで、本発明の多重エピトープペプチドと免疫学的に等価(重要度指数、T細胞活性化能等)な多重エピトープペプチドも、本発明に含まさ

れる。

Cry j 1 あるいは Cry j 2 由来の抗原ペプチドと反応する T 細胞は Th2 と Th0 の性質を有するものが多い (図3、図4)。ところで、BCGワクチンは細胞性免疫能を賦活することによって結核菌からの感染を予防する。細胞性免疫を賦活させるためには Th1 タイプの T 細胞を誘導しなければならないが、BCG接種したヒトの T 細胞クローンの性質を検討すると Th1 タイプの T 細胞が多いことが報告されている (松下 祥、第45回日本アレルギー学会、836頁、1995年)。松下の報告によれば、HLA-DR14(DRB1\*1405) 拘束性に結核菌 BCGa 蛋白の84-100 アミノ酸配列 (EEYLILSARDVLAVVSK)を認識するTh1 クローンが存在する。そこで、日本人の60%以上が持っているHLAハプロタイプであるDPA1-DPB1\*0501 拘束性の T 細胞エпитープを選択し (例えば図1のCry j 1 43番ペプチド (p211-225) / KSMKVTVA FNQFGPN)、このペプチドをDRB1\*1405 拘束性の結核菌 BCGa 蛋白の84-100 T 細胞エпитープとつないだ多重エпитープペプチドEEYLILSARDVLAVVSKRRMKVTVA FNQFGPNは、DRB1\*1405 のハプロタイプを持つスギ花粉症患者に当たる確率はかなり高くなると考えられる。このような多重エпитープペプチドを用いれば、BCGa 抗原由来ペプチドによって Th1 のリンホカイン、特に IL-12 の産生が期待できる。IL-12はIL-4 と相反する作用を持ち、T 細胞にはたらいて Th細胞の Th1 への分化を誘導することが多くのヒトおよびマウスの例で知られている (Manetti, R., et al.: J. Exp. Med., 177, 1199-1204, 1993; Wu, C., et al.: J. Immunol., 151, 1938-1949, 1993; Hsieh, C., et al.: Science, 260, 547-549, 1993)。特に、Manetti 等の実験結果ではダニアレルゲンの一つである Der p 1 抗原特異的な T 細胞クローンは通常 Th2 が誘導されるが、IL-12 存在下では Th1 又は Th0 が誘導されるとされている。従って、Th1 誘導能を持つ T 細胞エпитープとアレルゲン反応性の T 細胞エпитープを組み合わせた多重エпитープペプチドを用いることによって、本来 Th2 誘導性の T 細胞が Th1 又は Th0 タイプの T 細胞に誘導されることが期待される。

本発明のCry j 1及び／又はCry j 2のT細胞エпитープを少なくとも一つ含むペプチドをマウスに皮下投与するとその後のスギ花粉アレルゲンに暴露された場合にT細胞アナジーが生じ（図13、14）、IL-2産生量も対照群に比較して有意に低下する。ヒトの減感作療法の際はIL-2が減少するとの報告(J. Allergy Clin. Immunol. 76: 188, 1985)がある。さらに、本発明の多重エпитープペプチドは、当該ペプチドを構成する各T細胞エпитープペプチドに対するT細胞クローンのそれぞれを活性化し（図10）、かつ患者IgE抗体と反応しない（図8）。これらの結果は、本発明の多重エпитープペプチドがアレルゲンに対して免疫寛容を誘導し、アレルギー疾患のペプチド免疫療法剤としての有用性を示すものである。本発明多重エпитープペプチドは製薬学的に許容し得る担体または希釈剤と共に投与することができる。その有効量は、スギ花粉アレルゲンに対する感受性の程度、年齢、性別及び患者の体重、並びに患者における免疫応答を引き出すペプチドの能力などの因子に従って変化する。

投与経路は、注射（皮下、静脈内）、点鼻、点眼、経口、吸入、経皮などの簡便な方法で投与することができる。

なお、本明細書及び配列表におけるアミノ酸の1文字記号による表記は、IUPAC生化学命名委員会によって制定された表記とする（生化学辞典（第2版）1468頁表1.1参照）。

#### 図面の簡単な説明

図1は、スギ花粉症患者由来の細胞ラインのCry j 1オーバーラップペプチドに対する、平均刺激係数、出現頻度及び重要度指数（平均刺激係数×出現頻度）を示す図である。

図2は、スギ花粉症患者由来の細胞ラインのCry j 2オーバーラップペプチドに対する、平均刺激係数、出現頻度及び重要度指数（平均刺激係数×出現頻度）を示す図である。

図3は、Cry j 1の抗原ペプチドを拘束するHLAクラスIIタイプ及び当該抗原ペプチドとHLAクラスII拘束分子の複合体を認識するT細胞クローンのThタイプを示す図である。

図4は、Cry j 2の抗原ペプチドを拘束するHLAクラスIIタイプ及び当該抗原ペプチドとHLAクラスII拘束分子の複合体を認識するT細胞クローンのThタイプを示す図である。

図5は、抗原ペプチドと結合するHLAクラスII分子の遺伝子座レベル(DR、DQ、DP)における同定結果を示す図である。

図6は、抗原ペプチドと結合するHLAクラスII分子の各遺伝子座の対立遺伝子レベルにおける同定結果を示す図である。

図7は、多重エпитープペプチドに用いた抗原ペプチド結合配列を示す図である。図中a及びbはCry j 1のNo.43及び22のペプチドに対応し、cはCry j 2のNo.14に対応し、d、eは、No.37-38 (p181-200)、No.69-71 (p346-365) に対応する。

図8は、多重エпитープペプチド、C.A.#1、C.A.#2、C.A.#3、C.A.#4、C.A.#5、C.A.#6のヒトIgEとの反応性を示す図である。

図9は、T細胞クローンによる多重エпитープペプチド、C.A.#4に含まれるT細胞エпитープの認識結果を示す図である。

図10は、スギ花粉症患者と健常者の末梢血リンパ球に対する各種濃度の多重エпитープペプチド（配列番号：1）刺激によるリンパ球増殖応答能を示す図である。

図11は、2名の健常者と17名のスギ花粉症患者の末梢血リンパ球に対する配列番号：1の多重エпитープペプチド刺激による増殖応答能を示す図である。

図12は、CB6F1マウスに対するスギ花粉アレルゲンCry j 1投与による免疫寛容の誘導を示す図である。

図13は、CB6F1マウスに対するCry j 2のNo.14ペプチド（p66-80）投与による免疫寛容を示す図である。



図14は、CB6F1マウスに対するCry j 2のNo.48ペプチド (p236-250) 投与による免疫寛容を示す図である。

図15は、Cry j 1のNo.22ペプチド (p106-120) のコアアミノ酸配列決定を示す図である。

図16は、スギ花粉特異的T細胞エпитープペプチドとヒノキ花粉特異的T細胞エпитープペプチドからなる多重エпитープペプチドに対するスギ花粉症患者及びヒノキ花粉症患者のリンパ球の反応性を示す図である。

図17は、Cry j 1#22coreペプチドのアミノ酸置換アナログペプチドに対するT細胞クローンPJ7-9の増殖応答性およびその際のサイトカイン産生量を示す図である。

図18は、同上アナログペプチドに対するT細胞クローンPB10-18の増殖応答性およびその後のサイトカインの産生量を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

実施例1 T細胞ラインを用いたCry j 1及びCry j 2のT細胞エпитープの同定

18名のスギ花粉症患者末梢血リンパ球を、スギ花粉アレルゲンであるCry j 1またはCry j 2で刺激して、各アレルゲンを特異的に認識するT細胞ラインを患者別に樹立した。

96-ウエル平板培養プレート上で、マイトマイシンC処理した  $5 \times 10^4$  個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $2 \times 10^4$  個のT細胞ラインを、0.2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込み量を測定した。ペプチドを添加した際の $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みの値を、ペプチドを添加しない対照 $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込み量の値で割ることによって得られる値（刺激係数/Stimulation Index）が2以上である場合を、添加し

たペプチドが抗原ペプチドとして認識されたと定義する。

Cry j 1の場合、各患者が認識するCry j 1分子上のT細胞エпитープ部位は、平均9.8でありその範囲は $4 \leq \text{エピトープ数} \leq 15$ であった。他方、Cry j 2の場合は平均8.7であり、その範囲は $2 \leq \text{エピトープ数} \leq 13$ であった。Cry j 1は、353アミノ酸、Cry j 2は379アミノ酸で構成されるため、100アミノ酸残基あたりおよそ2.3~2.8箇所のT細胞エピトープ部位が存在することになる。

HLA-クラスIIタイプは、患者ごとに異なると考えられるため、認識されるT細胞エピトープは、HLA-クラスIIタイプごとに異なると予測される。そのため、各患者が認識する抗原ペプチドを患者ごとにマップした。その結果、Cry j 1、Cry j 2分子上では、各患者で認識され得るエピトープ部位は異なっていた。アレルゲン分子上では、個人によってT細胞エピトープとして認識され易い部位と認識されにくい部位が存在する。また、T細胞エピトープごとにT細胞の増殖率が異なるため、このエピトープマップのみでは、多重エピトープのデザインにどの抗原ペプチドを選定してよいのかの判定ができない。そこで、18名の患者について、刺激係数が2以上である場合の抗原ペプチドについて平均の刺激係数を算出し、この値に当該抗原ペプチドを保持する患者の割合（出現頻度）をかけることによって、エピトープごとの優位性を示す「重要度指数」を算出した（国際公開第94/01560号参照）。

図1と図2にその結果を示す。Cry j 1においては、ペプチド番号43番（p211-225）が重要度指数が679で最高値を示し、ペプチド番号22番の指数は578、ペプチド番号4番の指数は373と続いている。Cry j 2においては、ペプチド番号14番の指数が709で最高値を示し、ペプチド番号38番の指数が680、ペプチド番号48の指数が370と続いている。ペプチド免疫療法を考慮した場合には、重要度指数の高い抗原ペプチド一つを選定しペプチド免疫療法として使用する方法があるが、出現頻度の最も高い場合でも72%の患者でしか効果が期待できず、実際の有効率はさらに下がるであろう。有効率を上げるためにはいくつかのT細胞エピトープを組み合

わせる必要がある。この場合、T細胞エпитープの選定には、重要度指数の高いものが候補となるが、いくら重要度指数の高いエпитープのみを選択しても、これらのエпитープを抗原として提示するHLAクラスII分子が同一であれば有効率を上げることはできない。そのため、T細胞エпитープペプチドを提示するHLAクラスII分子のタイプを同定する必要がある。

#### 実施例2 T細胞クローンの認識するT細胞エпитープペプチドの同定

18名のスギ花粉症患者の中でCry j 1において高い重要度指数を示すペプチド番号43番と22番を認識する患者2名〔患者B（以下PBと略す）、患者J（PJ）〕とCry j 2において高い重要度指数を示すペプチド番号14番、38番、48番、69番を認識する患者3名〔PB、患者C（PC）、患者R（PR）〕を選定しこれらのスギ花粉症患者の末梢血リンパ球をCry j 1またはCry j 2で刺激してCry j 1またはCry j 2を認識するT細胞クローンを樹立した。4名の患者のHLA-クラスIとクラスIIタイプを以下に示す。

PB : A2/24 - B39/55 - Cw7/w3 - DRB1\*1501/0901 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101、DQ A1\*0102/0301 - DQB1\*0602/0303 - DPA1\*0101/0101 - DPB1\*0501/0201、

PJ : A24/- - B61/51 - Cw3/- - DRB1\*1501/0802 - DRB5\*0101、DQA1\*0102/0401 - DQB1\*0602/0402 - DPA1\*-/- - DPB1\*0501/0402、

PC : A-2/2 - B54/51 - Cw1/-、DRB1\*0405/1501 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101 - DQA 1\*0301/0102 - DQB1\*0401/0602 - DPA1\*0202/0202 - DPB1\*0201/0501、

PR : A-11/- - B60/35 - Cw7/w3 - DRB1\*0901/1501 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101 - DQA1\*0301/0102 - DQB1\*0303/0602 - DPA1\*01/0202 - DPB1\*0201/0201) 。

Cry j 1を特異的に認識するT細胞クローンを、PB由来末梢血リンパ球から計35種類、PJ由来末梢血リンパ球から計14種類樹立した。同様に、Cry j 2を特異的に認識するT細胞クローンを、PB由来末梢血リンパ球から計31種類、PC由来末梢血リンパ球から10種類、PR由来末梢血リンパ球から17種類樹立した。これらのT細胞クローンは全てCD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>-</sup>、TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>、TCR $\gamma\delta$ <sup>-</sup>であるため、拘束分子はHL

A-クラスII分子であることが判明した。96-ウェルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した $5 \times 10^4$ 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド及び $2 \times 10^4$ 個のT細胞クローンを  $0.2 \text{ ml}$ の15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。この操作で、各T細胞クローンの認識するT細胞エпитープを同定した。

作製したCry j 1を認識するT細胞クローンの中で69% (34/49) は抗原を含むペプチド刺激に対して増殖応答を示し、抗原ペプチドを同定できた。同様に、Cry j 2を認識するT細胞クローンの中で、69% (40/58) において抗原ペプチドを同定できた。Cry j 1を特異的に認識するT細胞クローンは、ペプチド番号4、13、19、22、30、31、39、43、51、66番、Cry j 2を特異的に認識するT細胞クローンは、ペプチド番号4、8、14、17、31、37、38、48、65、66、68、69、70番を認識していた。結果を図3と図4にまとめた。

### 実施例3 遺伝子座レベルにおけるHLAクラスII拘束分子の同定

実施例2で樹立したT細胞クローンの増殖応答系に、HLA-クラスIIの DR、DQ、またはDPに対して特異的に反応する単クローン抗体を添加して、T細胞の増殖応答を阻止することにより、遺伝子座レベルでのHLAクラスII拘束分子を同定した。

96-ウェルマイクロ培養プレート上で、マイトマイシンC処理した $2 \times 10^4$ 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $3 \mu\text{g/ml}$ の抗 DR、DQ、またはDP単クローン抗体（ベクトン/ディッキンソン社製）、 $2 \times 10^4$ 個のT細胞クローンを、 $0.2 \text{ ml}$ の15%血清を含むRPMI-1640 培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。結果を図5に示す。この図から、Cry j 1 p106-120、Cry j 2 p66-80、Cry j 2 p186-200ペプチドの拘束分子はDR、Cry j 2 p341-355 ペプ

チドの拘束分子はDQ、Cry j 1 p211-225、Cry j 2 p181-195の拘束分子はDPであることがわかる。他のT細胞クローンの拘束分子についても同様に解析した（図3及び図4参照）。

#### 実施例4 HLAクラスII分子の個々のタイプにおける拘束分子の同定

HLAクラスII遺伝子座レベルでの拘束分子が同定できたT細胞クローンを、DRに関しては、個々のタイプを遺伝子導入したマウスL-細胞、DQまたはDPに関しては、タイプに関してハプロタイプの一致するB細胞株を抗原提示細胞として用いることにより個々のタイプにおける拘束分子の同定が可能である。

96-ウェルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した $5 \times 10^4$ 個のマウスL-細胞、またはハプロタイプの一致するB細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $3 \mu\text{g/ml}$ の抗DR、DQ、またはDP単クローン抗体（ベクトン/ディッキンソン社製）、 $2 \times 10^4$ 個のT細胞クローンを0.2 mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。

T細胞クローンの増殖応答が観察された場合に、拘束分子が同定できる。Cry j 1 p106-120ペプチドを提示する拘束分子はDRB5\*0101、Cry j 1 p211-225ペプチドを提示する拘束分子はDPA1\*0101 - DPB1\*0501、Cry j 2 p66-80ペプチドを提示する拘束分子はDRB5\*0101、Cry j 2 p181-195ペプチドを提示する拘束分子はDPA1\*0101 - PDB1\*0201、Cry j 2 p186-200ペプチドを提示する拘束分子はDRB4\*0101、Cry j 2 p341-355ペプチドを提示する拘束分子はDQA1\*0102 - DQB1\*0602であった（図6）。他のエピトープ部位についての解析結果は図3及び図4に記載されている。

#### 実施例5 T細胞クローンのThタイプの同定

アレルギーの発症にはTh2細胞の関与が想定されている。現在の研究レベルでは、抗原刺激後、T細胞のTh1またはTh2細胞への分化が、特定のエピトープペプチド

またはHLA-クラスII遺伝子座レベルで規定されているのかはまだ、未解決な部分が多い。しかし、ペプチドで刺激後、Th2細胞が優位に誘導される場合には、ペプチド投与によりスギ花粉症が悪化する可能性が高い。実施例2で作製したT細胞クローンをT細胞が認識するエピトープペプチドで刺激し、IL-2、IL-4、IFN $\gamma$ の産生量を測定することによってThタイプを決定した。

24-ウエルミクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した $1 \times 10^5$ 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のエピトープペプチド、 $5 \times 10^5$ 個のT細胞クローンを1mlの10%ヒト血清を含むRPMI-1640培養液中で24時間培養した。遠心で細胞を沈澱させ、培養上清を得た。培養上清中のIL-2、IL-4、IFN $\gamma$ は市販のELISAキット [IL-2(R&D 社製)]、IL-4 (メドジェニックス社製)、IFN $\gamma$  (大塚アッセイ研究所製) で測定した。

各T細胞クローンの産生するIL-2、IL-4、IFN $\gamma$ 量を図3、図4に示す。Cry j 1を認識するT細胞クローンは、Th2細胞が12、Th1細胞が1、Th0細胞が16であり、Th2がTh1よりも多かったが、Cry j 2を認識するT細胞クローンはTh2細胞が10、Th1細胞が8、Th0細胞が8であり、Th2とTh1とは同程度であった。個々のT細胞クローンの認識するT細胞エピトープ、拘束分子、Thタイプを比較すると、個々のT細胞クローンによってTh2、Th1、Th0タイプは異なり、同一のエピトープ、同一の抗原提示分子を認識する数個のT細胞クローンには、Th2細胞とTh1細胞が見いだされている。これらの結果は、Cry j 1またはCry j 2刺激後のT細胞のTh2、Th1、またはTh0細胞への分化は、特定のT細胞エピトープ、特定の拘束分子の組み合わせでは規定されていないことを意味している。つまり、T細胞エピトープ部位を含むペプチドは全て、本発明の多重エピトープペプチドの候補となりうることが判明した。

#### 実施例6 多重エピトープペプチドの作製

Cry j 1及びCry j 2分子中に存在するIgE抗体エピトープ部位を同定した結果、Cry j 1にはこの一次構造を認識するIgEエピトープは存在しないこと、Cry j 2に

はIgE抗体エпитープが少なくとも4ヶ所存在することが明らかとなったが、これらのIgE抗体エпитープ部位は、T細胞エпитープ部位とは異なる部位であった。この知見をもとに、Cry j 1及びCry j 2のT細胞エпитープ部位のうち、図7に示すペプチドを選択した。

図7のペプチドa、bはそれぞれ図1のCry j 1のペプチドNo. 43、22に対応し、ペプチドcは図2のCry j 2のNo. 14に対応し、d、eはそれぞれ図2のCry j 2の37-38及び69-71のアミノ酸の一部からなるものである。

これらの6種類のペプチドを直列につなぎ合わせて多重エпитープペプチドを製作する場合、2つのペプチドとaとbはa-bの順で固定し残りの3つのペプチド(c、d及びe)をランダムにつなぎ合わせ且つ各ペプチドの間にArg-Argの配列を挿入した多重エпитープペプチドは下記の6種類となる。

- C.A. # 1. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e
- C.A. # 2. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d
- C.A. # 3. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e
- C.A. # 4. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c
- C.A. # 5. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d
- C.A. # 6. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c

#### 実施例7 多重エпитープペプチドのヒトIgE抗体に対する反応性

実施例6で得た6種の多重エпитープペプチド(C.A. # 1～# 6)を0.2M酢酸緩衝液(pH4.5)に溶解させ、0.1ml/ウェルでブラックプレート(大日本製薬社製)に加えて4℃で一晩放置した。抗原溶液を除去した後、洗浄液で3回洗浄し、29名のスギ花粉患者及び健常人血清(4倍希釈)を加えて、37℃で4時間反応させた。血清を除去後、洗浄液で3回洗浄し、抗ヒトIgE抗体(Pharmacia社製)を室温で一晩反応させた。洗浄液で3回洗浄後、0.1mM 4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド/0.01M リン酸緩衝液(pH 7.0)、0.1M NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% NaN<sub>3</sub>、0.1% BSAの基質溶液を加え、37℃で2時間反応させた。0.1M グリシン/Na

0H、pH10.3溶液をこれに加えて反応を停止させ、蛍光分光光度計(Labsystems)で蛍光強度を測定した。なお、各多重エпитープペプチドに対する陽性コントロールとしてビオチン標識ウサギ抗dエпитープIgGとペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ピアス社製)を反応させた。

この結果、29名全てのヒト血清は、6種の多重エпитープペプチド(C.A.#1～#6)全てについて蛍光強度が3～5であった(ブランク値は3又は4)。これに対してスギ花粉から抽出、精製した抗原であるCry j 1には、蛍光強度1,000以上が6名、100以上が14名、10以上が4名、9以下が5名であった。一方、ウサギ抗dエпитープペプチドIgGは6種のコンセンサスアレルゲンに対して3,000以上を示した(ブランク値は112、Cry j 1アレルゲンには230)。以上のことから、多重エпитープペプチドにおける各エпитープの接続順序はヒトIgE抗体との反応性に影響を与えないことが判明した(図8)。

#### 実施例8 多重エпитープペプチドのT細胞エпитープの認識の有無

実施例6で得た多重エпитープペプチドのうちC.A.#4を構成する抗原ペプチドが実際にT細胞エпитープとして機能しているかどうかについて検討した。

96-ウエルミクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した $5 \times 10^4$ 個の自己由来B細胞株、 $2 \times 10^4$ 個のT細胞クローンを、0.2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で、抗原として50 $\mu$ g/mlのCry j 1、2 $\mu$ g/mlのCry j 2、多重エпитープペプチドC.A.#4を構成する個々の抗原ペプチド、または遺伝子発現で作製した10 $\mu$ g/mlのC.A.#4多重エпитープペプチドのいずれかと共に2日間培養し、0.5 $\mu$ Ciの $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに16時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。結果を図9に示す。

Cry j 1 p106-120を認識するT細胞クローンPB8-3、Cry j 1 p211-225を認識するT細胞クローンPB8-34、Cry j 2 p66-80を認識するT細胞クローンPB4-22、Cry j 2 p181-195を認識するT細胞クローンPB14-5、Cry j 2 p186-200を認識するT細胞



胞クローンPB14-34はいずれも抗原ペプチドによく反応している。一方、多重エпитープペプチドの場合も、個々のペプチドと同様の強さでT細胞クローンが増殖応答している。Cry j 2 p341-355を認識するT細胞クローンPB14-19に関しては、多重エпитープペプチド刺激に対してやや弱い増殖応答が観察された。

以上の結果は多重エпитープペプチドに含まれる抗原ペプチドは各々エイトープとしてよく機能し、T細胞を活性化する能力を保持していることを示している。

#### 実施例 9 多重エイトープペプチドによるスギ花粉症患者末梢血リンパ球の増殖応答

多重エイトープペプチドはT細胞エイトープ部位を含むため、ペプチド免疫療法を試みる場合には、末梢血リンパ球に増殖応答を惹起させることが必要である。多重エイトープペプチドで末梢血リンパ球を刺激し、増殖応答が観察されるかについて調査した。

スギ花粉症患者または健常人由来末梢血リンパ球を10%ヒト血清を含むRPMI-1640培養液に懸濁した後、96-ウェル丸底培養プレートの各ウェルに $2.5 \times 10^5$ 個/200 $\mu$ lになるように播種した。配列番号：1の多重エイトープペプチド、Cry j 1またはCry j 2のいずれかを、多重エイトープペプチドが最終濃度0.001~20 $\mu$ g/ml、Cry j 1が50 $\mu$ g/ml、Cry j 2が2 $\mu$ g/mlになるように添加し、6日間培養した。0.5 $\mu$ Ciの $[^3\text{H}]$ チミジンを添加してさらに16時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。

患者6名の中で5名の末梢血リンパ球が多重エイトープペプチドに対して増殖応答を示した。患者1名と健常人2名の末梢血リンパ球は増殖応答を示さなかった（図10）。

末梢血リンパ球の増殖応答は0.1 $\mu$ g/mlの多重エイトープペプチド刺激で起こり始め、投与量に比例して増殖応答は増大した。この結果から、in vitroで十分なT細胞増殖応答を誘導する多重エイトープペプチドの濃度は10 $\mu$ g/ml以上であると

判断された。

17名のスギ花粉症患者と2名の健常者由来末梢血リンパ球を $10\mu\text{g/ml}$ の多重エпитープペプチドで刺激し、T細胞応答を算定した。健常人の末梢血リンパ球ではT細胞増殖応答能が観察されなかった。17名の患者では最高で9,652cpmの $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みが観察された。抗原刺激なしの末梢血リンパ球の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを1と計算し、抗原存在下の末梢血リンパ球の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み値を刺激係数 (SI) で表現し、結果を図 11 に示した。T細胞エпитープの同定の際には $\text{SI} > 2$ 以上を陽性とみなすため、同様に $\text{SI} > 2$ 以上をペプチドに対して増殖応答が観察されたとみなすことにすると、17名の患者の中で13名 (76.5%) に増殖応答がみられた。この結果から、スギ花粉症患者にペプチドを投与した場合には76.5%の患者においてペプチド免疫療法の効果があると判定される。

スギ花粉症患者に、本発明の多重エпитープペプチドでペプチド免疫療法を試みる場合、前もって、患者由来末梢血リンパ球の多重エпитープペプチドに対する増殖応答能を調査し、増殖応答の見られる患者を選定することができる。この試験によって多重エпитープペプチドを用いたペプチド免疫療法がその患者に適用できるのかが判定できるし、増殖応答能の高さから治療効果についてもある程度の予測ができると考えられる。

#### 実施例 10 マウスを用いたスギ花粉アレルゲン投与による免疫寛容の誘導

スギアレルゲンを投与して治療を行なう、いわゆる減感作治療のメカニズムについて、詳細はわかっていない。そこでマウスを用いた動物実験を行なった。スギ花粉アレルゲン、Cry j 1 を1匹当たり $300\mu\text{g}$ 、CB6F1マウス (雌、5匹) の皮下に5日間隔で2回投与した。コントロールとして同容量の PBS を皮下投与 (雌、5匹) した。さらに5日後に Cry j 1  $100\mu\text{g}$  を Alum アジュバンドと共に皮下に投与して免疫を行ない、さらに10日後にリンパ節細胞を単離し、コントロール群マウスのリンパ節細胞、Cry j 1 投与マウスのリンパ節細胞をそれぞれの群単位でプールした。プールしたリンパ球に Cry j 1 を 0, 50, 150  $\mu\text{g/ml}$  加え、さら

に3日間培養を行ない、培養上清を採取して含まれる IL-2 を測定した (Endogen 社製)。その結果を図 1 2 に示す。コントロール群である PBS 投与マウスは Cry j 1 濃度が 0, 50, 150  $\mu\text{g/ml}$  と増加すると共に IL-2 の産生量が増加した。一方、Cry j 1 投与マウスはこれらのコントロールマウスに比べ明かに IL-2 の産生量が減少し、スギ花粉アレルゲン投与によって免疫寛容が生じた。この結果は現在用いられているスギ花粉アレルゲンによる減感作療法の有効例を再現している。

#### 実施例 1 1 CB6F1マウスのT細胞エピトープの同定

8週齢の雄CB6F1マウスをアジュバント (Imject Alum: ビアス社製) と共に組み換えCry j 2 (rCry j 2) 10 $\mu\text{g}$ で2週間おきに3回免疫した(ip)。最終免疫から1週間後にマウス3匹から脾細胞を調製し一つにまとめた。96ウエルプレート (ファルコン社製) 1ウエルに対し脾細胞 ( $5 \times 10^6$ ) を15残基からなる74種類のCry j 2のオーバーラッピングペプチド (0.115 $\mu\text{M}$ ) のそれぞれと共に0.2mlのRPMI培地 (10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml ペニシリン、50 $\mu\text{g/ml}$  ストレプトマイシン) で培養した。対照としてPBS、50 $\mu\text{g/ml}$  Cry j 1、0.3 $\mu\text{g/ml}$  rCry j 2のそれぞれに対する反応も検討した。各々の試験試薬に対し3ウエル播種し、37°C、5%  $\text{CO}_2$ 条件下で3日間培養した。最後の6時間0.5 $\mu\text{Ci}$ /ウエルの $[\text{}^3\text{H}]$ -チミジンでパルスラベルを行いセルハーベスター (Inotech、ベルトールドジャパン社製) で細胞をガラスフィルター上に補集し、乾燥した後、液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 4530、バッカードジャパン社製) で $[\text{}^3\text{H}]$ -チミジンの細胞内取り込みを測定した。

rCry j 2で免疫したCB6F1マウスは抗原であるrCry j 2に強い反応性を示したが、もう一つのスギ花粉主要アレルゲンであるCry j 1には反応せず、この系が抗原特異的反応であることが確認された。そして、rCry j 2で免疫したCB6F1マウスは、調べた74種類のオーバーラッピングペプチドのうち図 2 に示すNo.14ペプチドとNo.48ペプチドに顕著な応答性を示した。このことからCB6F1マウスにおいてNo.1

4とNo.48のペプチドが主要T細胞エпитープとして抗原提示に関与していることが示された。ヒトにあってもNo.14とNo.48のペプチドは主要T細胞エпитープペプチドであることから、CB6F1マウスはスギ花粉に対するペプチド免疫療法に使用するペプチドの有効性を評価するうえで有用なモデル動物になりうると判断された。

#### 実施例 1 2 抗原ペプチドNo.14のインビボにおける免疫応答

1群8匹の雄CB6F1(8週令、雄)マウス1匹当り生理食塩水に溶解した3mg No.14ペプチドを、5日間隔で2回皮下投与した。対照群としては等容量(100 $\mu$ l)の生理食塩水を同様に投与した。2回目のペプチド投与後5日目にインジェクトアルム(Imject Alum)と混合したrCry j 2(50 $\mu$ g/匹)で全てのマウスを皮下免疫した。免疫1週間後に各々のマウスから脾細胞を調製した。96ウエルプレート(ファルコン)1ウエルに対し脾細胞( $5 \times 10^6$ )をrCry j 2(3 $\mu$ g/ml)と共に0.2mlのRPMI培地(10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml ペニシリン、50 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン)で培養した。対照としてrCry j 2を含まない条件下で培養した。<sup>3</sup>H-チミジンによるT細胞増殖の測定は、実施例1に記載された方法に準じて行った。サイトカイン測定は、対照を含めた3種類のペプチド投与群(0.3, 1.3, 10 $\mu$ g/ml)について、in vitroで0.3 $\mu$ g/mlのCry j 2で刺激したときの培養上清を用いた。

CB6F1マウスに予めNo.14ペプチドを皮下投与しておくで続くrCry j 2による抗原刺激に対し、T細胞の免疫応答性が生理食塩水投与群に比べ有意( $p < 0.01$ )に抑制された(図13)。IL-2産生に関しては、3種類のペプチド投与群においてそれぞれ対照群より有意に減少した。このことからマウスのモデル系においてNo.14ペプチドはスギ花粉アレルギーに対しペプチド免疫療法の予防効果を有することが示された。

#### 実施例 1 3 抗原ペプチドNo.48のインビボにおける免疫応答

6週齢の雄CB6F1マウス1匹当り生理食塩水に溶解した3mg No.48ペプチドを、5日間隔で2回皮下投与した。対照群としては等容量(200 $\mu$ l)の生理食塩水を同様に投与した。ペプチド投与群及び対照群の動物数は各々8匹とし、2回目のペプチ

ド投与から5日目にアジュバント (Imject Alum) と混合したrCry j 2(50 $\mu$ g)で全てのマウスを皮下免疫した。免疫1週間後に各々のマウスから脾細胞を調製した。96ウエルプレート (ファルコン) 1ウエルに対し脾細胞 ( $5 \times 10^6$ ) をrCry j 2 (3 $\mu$ g/ml) と共に0.2mlのRPMI培地 (10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/mlペニシリン、50 $\mu$ g/mlストレプトマイシン) で培養した。対照としてrCry j 2を含まない条件下で培養した。<sup>3</sup>H-チミジンによるT細胞増殖の測定は実施例10に記載された方法に準じて行った。

CB6F1マウスに予めNo.48ペプチドを皮下投与しておくとするrCry j 2による抗原刺激に対し、T細胞の免疫応答性が生理食塩水投与群に比べ有意に抑制された( $p < 0.05$ )。このことからマウスのモデル系においてNo.48ペプチドはスギ花粉アレルギーに対しペプチド免疫療法による予防効果を有することが示された (図14)。

以上の実験結果から、従来行われてきたヒトにおけるスギ花粉抽出エキスによる減感作療法がT細胞エビトープを介した作用機作であることが明らかになった。

#### 実施例14 コア配列の決定

Cry j 1 ペプチド番号22番 (p106-120) のT細胞ラインおよびT細胞クローン増殖応答に必要なアミノ酸配列(core)を決定するために、図15に示すようにこのペプチドのN末端およびC末端から1残基づつのアミノ酸を削除してp107-120 (p22-2), p108-120 (p22-3), p109-120(p22-4), p110-120(p22-5), p111-120(p22-6), p106-119(p22-7), p106-118(p22-8), p106-117(p22-9), p106-116(p22-10), p106-115(p22-11)の11種類のペプチドをペプチド合成機(PSSM-8, 島津製作所製)により合成した。Cry j 1ペプチド番号22番のp106-120 と反応する3名のスギ花粉症患者のT細胞ライン (PJ, PR, PB)、および患者1名のT細胞クローン (PB 8-3, PB 8-2, PB 9-39) を実施例1及び2の方法を用いてこれら11種類のペプチドに対する反応性を検討した。2種類のT細胞ライン(PJ, PB)と2種類のT細胞クローン(PB 8-2, PB 9-39)はp106-120 (p22-1)を認識して増殖したが、1種類の

T細胞ラインとT細胞クローンは増殖応答を示さなかった(図15)。この結果、p106-120コア配列は「FIKRVSNI」の9残基であることが判明した(この9残基をCry j 1 #22 core と表示する)。

実施例15 スギ花粉およびヒノキ花粉アレルゲン由来T細胞エпитープを含む多重エピトープペプチド

ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1 のT細胞エピトープ(特願平8-153527号)であるペプチド番号8(p71-90; IFSKNLNILNMPYIAGNK),あるいはペプチド番号32(P311-330; SSGKNEGNIYNNNEAFKVE)と実施例14で得られたCry j 1 #22 コア配列「FIKRVSNI」をつないだペプチド2種類 (Cha o 1 #8-Cry j 1 #22 core, Cha o 1 #32-Cry j 1 #22 core )をペプチド合成機 (PSSM-8; 島津製作所製) で合成した。Cha o 1 #8とCry j 1 #22 core, Cha o 1 #32とCry j 1 #22 coreとの間には RR 配列を挿入した。即ち Cha o 1 #8-Cry j 1 #22 core (配列番号: 4) と Cha o 1 #32-Cry j 1 #22 core (配列番号: 5) である。

スギ花粉症患者およびヒノキ花粉症患者からそれぞれCry j 1 特異的T細胞ラインおよびCha o 1 特異的T細胞ラインをそれぞれ作製した。Cry j 1 特異的T細胞ラインおよびCha o 1 特異的T細胞ラインは、結核菌抗原(PPD)および溶連菌細胞壁(SCW)抗原とは反応せず、またCry j 1 特異的T細胞ラインはCry j 1 #22あるいはCry j 1 #22 core とは反応するが、Cha o 1 #8 及び#32とは反応せず、Cha o 1 特異的T細胞ラインはCha o 1 #8及び#32とは反応するが Cry j 1 #22あるいはCry j 1 #22 coreとは反応しなかった(図16)。一方これらのT細胞ラインはいずれも、配列番号: 4の多重エピトープペプチド及び配列番号: 5の多重エピトープペプチドの両方に反応した。これらの結果から、スギ花粉およびヒノキ花粉アレルゲン由来のT細胞エピトープをつないだ多重エピトープペプチドは、スギ花粉症患者およびヒノキ花粉症患者のペプチド免疫療法に有効であることが明らかとなった。

実施例16 アナログペプチドの増殖応答およびサイトカイン産生

Cry j 1#22 coreのT細胞エピトープペプチドのアミノ酸を置換することによってT細胞の活性を調節することが可能か否かを、2つのクローンPJ7-9及びPB10-18を用いて検討した。Cry j 1ペプチド番号22番p106-120 に反応するT細胞クローンPJ 7-9及びPB10-12は、DRB5\*0101を拘束分子とし、Cry j 1#22coreの9残基を認識する。この9残基を含む13残基のペプチドp108-120 (VFIKRVSNVIIHG) 中の9残基の各アミノ酸を、類似アミノ酸、非類似アミノ酸の2種類のアミノ酸によって置換したアナログペプチドを合成した(図17、18)。そして、これらのアナログペプチドに対するT細胞クローンPJ7-9及びPB10-18の反応性を $[^3\text{H}]$ チミジンの取込み量で調べた。反応溶液中のサイトカイン濃度は、R&D Systems 社製のサイトカイン測定キットで測定した。その結果を、図17及び図18に示した。ここで、アミノ酸置換していない13残基のペプチドを反応させた上清のIFN  $\gamma$ 、IL-4、IL-2、IL-5の産生量及び細胞の $[^3\text{H}]$ チミジンの取込み量をそれぞれ100%とした。PJ7-9クローンの場合、Cry j 1#22core「FIKRVSNVI」の3、4、6番目の各アミノ酸部分「K」「R」「S」は類似アミノ酸置換と非類似アミノ酸置換の両者、あるいは非類似アミノ酸置換により $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みおよびサイトカインの産生量がそれぞれ著しく抑制された(図17)。従って、これらの部分のアミノ酸はペプチドを介したHLA 分子とT細胞レセプター分子の複合体形成に重要な部分と考えられる。1番目のアミノ酸(F)を類似アミノ酸であるYに置換しても $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み量とIL-4、IL-5の産生量に変化は認められないが、非類似アミノ酸である「S」に置換すると $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み量に変化は認められないにもかかわらず、IFN  $\gamma$ とIL-2の産生量は著しく増大した。PB10-18クローンの場合は、Cry j 1#22coreの1、2、3、4、6、7、8番目のアミノ酸置換によって $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みが抑制され、これらの部分のアミノ酸はペプチドを介したHLA 分子とT細胞レセプター分子の複合体形成に重要な部分と考えられる。さらに6、7、8番目のアミノ酸置換によってIL-5の産生量に比較してIL-2の産生抑制が認められた(図18)。これらの結果から、Cry j 1#22coreの1番目の

アミノ酸FをSに置換した「SIKRVSNVI」が IFN- $\gamma$ の産生量を増大させたことにより、アレルギーの治療剤として有用であることが明らかとなった。

#### 産業上の利用の可能性

本発明の多重エピトープペプチドは、異なるアレルゲン分子由来のT細胞エピトープペプチドを含み、かつ、アレルギー患者集団の中で遺伝子頻度の高いHLAクラスII分子で提示されるペプチドを含み、さらには、HLAクラスII遺伝子座（DR、DQ、DP）間で異なる分子で提示されるペプチドを数個含むので、最小の多重エピトープペプチドの長さで、有効対象患者数を拡大したペプチド免疫療法が期待できる。

また、アレルギー患者に、本発明の多重エピトープペプチドを用いてペプチド免疫療法を試みる場合、前もって、患者由来の末梢血リンパ球の該ペプチドに対する増殖応答能を調査し、増殖応答が惹起される患者を選定することができる。この調査によって、多重エピトープペプチドによるペプチド免疫療法がその患者に適用できるかどうかの判定が可能であり、増殖応答能の高さから、治療効果についてもある程度予測が可能である。



配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 80

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

MKVTVAFNQF	GPNNRVFIKR	VSNVIIHGRR	IDIFASKNFH	40
LQKNTIGTGR	RISLKLTS GK	IASRRVDGII	AAYQNPASWK	80

配列番号 : 2

配列の長さ : 105

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

MKVTVAFNQF	GPNNRVFIKR	VSNVIIHGRR	IDIFASKNFH	40
LQKNTIGTGR	RWKNNRIWLQ	FAKLTGFTLM	GRRLKMPMYI	80
AGYKTFDGRR	VDGIIAAYQN	PASWK		105

配列番号 : 3

配列の長さ : 134

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

## 配列

MKVTVAFNQF GPNRRVFIKR VSNVIIHGRR IDIFASKNFH 40  
LQKNTIGTGR RWKNNRIWLQ FAKLTGFTLM GRRPLWIIFS 80  
GNMNIKLKMP MYIAGYKTFD GRRAEVSYPH VNGAKFIRRV 120  
DGIIAAYQNP ASWK 134

配列番号 : 4

配列の長さ : 31

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

## 配列

IFSKNLNIKL NMPLYIAGNK RRFIKRVSNV I 31

配列番号 : 5

配列の長さ : 31

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

## 配列

SSGKNEGTHI YNNNEAFKVE RRFIKRVSNV I 31

## 請求の範囲

1. 異なるT細胞エпитープ領域を連結した1分子の直鎖状ポリペプチドであって、
  - (1) 前記T細胞エпитープ領域の各々が前記アレルゲンに感受性の患者集団において測定した重要度指数が約100以上を示し、
  - (2) 前記アレルゲンに対し感受性の患者集団の少なくとも70%以上の患者の末梢血リンパ球と反応し、
  - (3) 前記アレルゲンに対する感受性の患者集団のIgE抗体と実質的に反応しない、多重エпитープペプチドの有効量を含有することを特徴とする、ペプチド免疫療法剤。
2. 異なるT細胞エпитープ領域が2種以上の異なるアレルゲン分子に由来するものである、請求項1記載のペプチド免疫療法剤。
3. 異なるアレルゲン分子がスギ花粉アレルゲンCry j 1およびCry j 2である、請求項2記載のペプチド免疫療法剤。
4. 各々のT細胞エпитープ領域の間に抗原提示細胞内でプロセッシングを受ける部位を介在させた、請求項1記載のペプチド免疫療法剤。
5. 抗原提示細胞内プロセッシングを受ける部位がアルギニンダイマーまたはリシンダイマーである、請求項4記載のペプチド免疫療法剤。
6. 配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項3記載のペプチド免疫療法剤。
7. HLAクラスII分子DRB5\*0101、DRB4\*0101、DQA1\*0102-DQB1\*0602、DPA1\*0101-DPB1\*0501またはDPA1\*0101-DPB1\*0201の少なくとも1つを拘束分子とするエпитープを含む、請求項3記載のペプチド免疫療法剤。
8. 異なるアレルゲン分子がスギ花粉アレルゲンCry j 1およびヒノキ花粉アレルゲンCha 0 1である請求項2記載のペプチド免疫療法剤。

9. 配列番号：4、または配列番号：5に記載のアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項8記載のペプチド免疫療法剤。

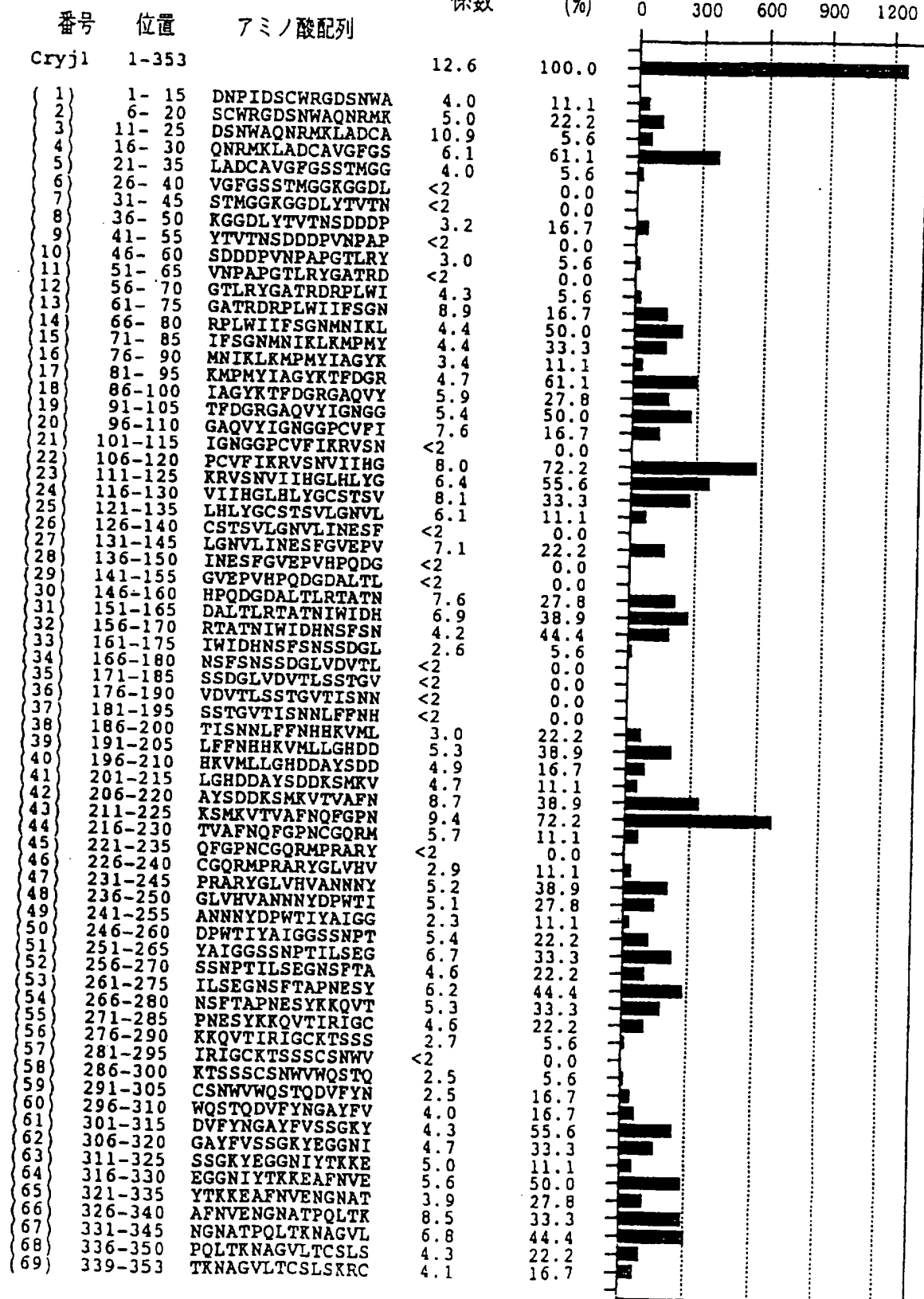
1 / 18

図 1

## 重要度指数

Cry j1 ペプチド

平均刺激 出現頻度 (平均刺激係数 x 出現頻度(%))

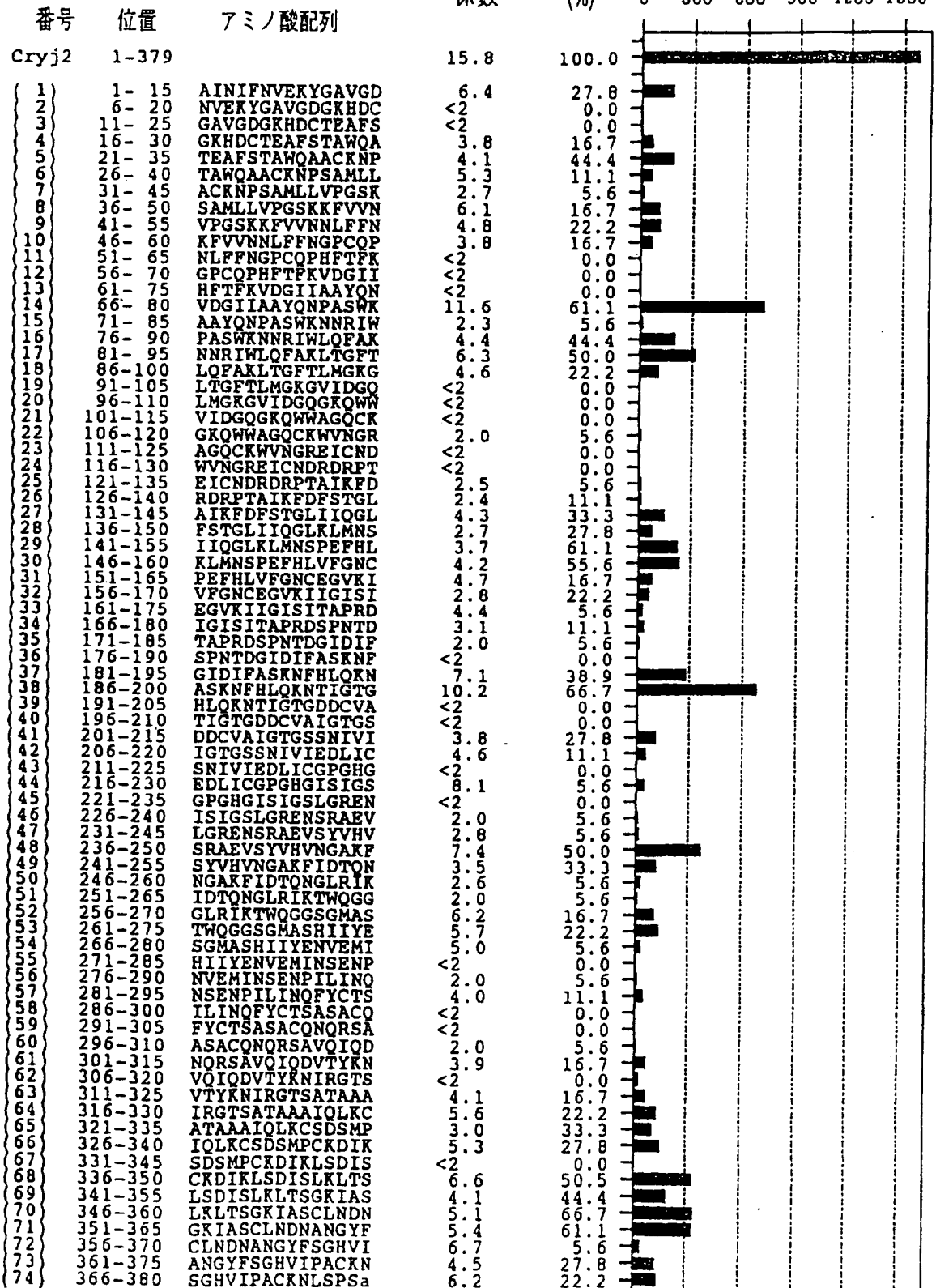


2 / 18

図 2

## 重要度指数

Cry j 2 ペプチド

平均刺激  
係数出現頻度 (平均刺激係数 x 出現頻度(%))  
(%) 0 300 600 900 1200 1500

3/18

図3

Cry j 1 を認識する T 細胞クローンの Th タイプ

T 細胞 クローン	エピトープ部位		拘束分子	リンフォカイン産生(pg/ml)			Th* タイプ
	番号	位置		IL-2	IFN $\gamma$	IL-4	
PJ4-6	4	16- 30	DQA1*0102 DQB1*0602	<31	1500	334	Th0
PB8-1	4	16- 30	"	<31	<31	814	Th2
PB9-37	13	61- 75	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	<31	7760	Th2
PB10-24	13	61- 75	"	39	151	4500	Th2
PJ1-27	19	91-105	DQ	32	1220	224	Th0
PB3-27	22	106-120	DRB5*0101	250	332	21000	Th2
PB8-2	22	106-120	"	190	2110	5709	Th0
PB8-3	22	106-120	"	<31	1270	10100	Th0
PB9-39	22	106-120	"	48	51	5120	Th2
PB10-18	22	106-120	"	410	46	7840	Th2
PJ4-29	22	106-120	"	4680	14200	6610	Th0
PJ7-9	22	106-120	"	1370	1040	12200	Th2
PJ5-6	30	145-160	DQA1*0102-DQB1*0602	1500	1170	5920	Th0
PJ5-9	30	145-160	"	1720	825	266	Th0
PB11-21	31	151-165	DRB1*0901	4190	>20000	4510	Th0
PB11-24	31	151-165	"	670	11700	1950	Th0
PB6-37	31	151-165	"	<31	<31	49	Th2
PB1-8	39	191-205	DQA1*0102-DQB1*0602	820	188	1760	Th0
PB9-34	39	191-205	DRB1*0901又はDRB4*0101	<31	86	1680	Th2
PB2-14	43	211-225	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	376	2320	Th0
PB7-2	43	211-225	"	84	2740	2080	Th0
PB8-32	43	211-225	"	<31	4870	1840	Th0
PB8-34	43	211-225	"	78	14800	3040	Th0
PB11-23	43	211-225	"	<31	3990	1260	Th0
PB11-26	43	211-225	"	32	1100	6520	Th0
PB4-20	43	211-225	"	<31	<31	133	Th2
PB10-4	43	211-225	"	<31	<31	4170	Th2
PB8-4	51	251-265	DQA1*0102-DQB1*0602	44	36	4050	Th2
PJ4-20	66	326-340	DQA1*0102-DQB1*0602	560	3080	<32	Th1

\* IL-4/IFN $\gamma$  >10 を Th2、IFN $\gamma$ /IL-4 >10 を Th1 その中間を Th0 と定義する。

4/18

図 4

Cry j 2 を認識する T 細胞クローンの Th タイプ

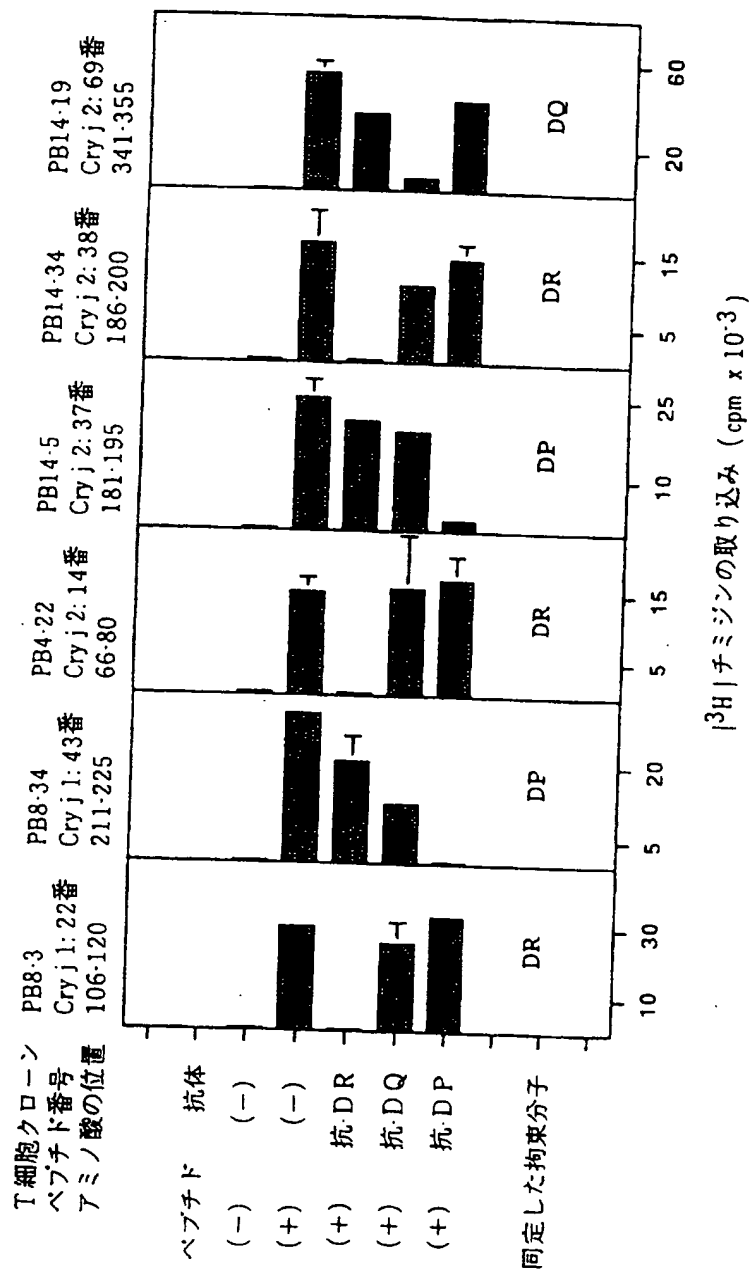
T 細胞 クローン	エпитープ部位		拘束分子	リンフォカイン産生(pg/ml)			Th* タイプ
	番号	位置		IL-2	IFN $\gamma$	IL-4	
PB5-29	4	16- 30	DRB1*0901又はDRB4*0101	<31	503	97	Th0
PB11-40	4	16- 30	"	<31	<31	50	Th2
PB14-4	4	16- 30	"	<31	<31	<16	Thp
PB12-33	8	36- 50	DRB1*1501	<31	>8000	<16	Th1
PR2-25	8	36- 50	"	47	<31	977	Th2
PR5-40	8	36- 50	"	1150	1330	355	Th0
PB3-32	14	66- 80	DRB5*0101	<31	<31	323	Th2
PB4-21	14	66- 80	"	<31	109	239	Th0
PB4-22	14	66- 80	"	<31	483	158	Th0
PC1-8	14	66- 80	"	<31	2710	32	Th1
PR4-20	14	66- 80	"	<31	312	338	Th0
PR3-21	14	66- 80	"	<31	<31	338	Th2
PB13-18	17	76- 90	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	3320	231	Th1
PB11-32	17	76- 90	"	138	60	2090	Th2
PR1-20	31	151-165	DRB1*0901	<31	<31	18	Th2
PR4-39	31	151-165	"	<31	<31	<16	Thp
PB14-5	37	181-195	DPA1*0101-DPB1*0201	87	126	469	Th0
PB14-13	37	181-195	"	<31	59	2440	Th2
PB14-34	38	186-200	DRB4*0101	186	420	93	Th0
PC3-40	38	186-200	"	<31	<31	379	Th2
PB5-3	48	236-250	DRB1*1501又はDRB5*0101	2570	>8000	525	Th1
PR2-34	65	321-335	DRB1*0901	57	1990	464	Th0
PR3-30	66	326-340	DQA1*0102-DQB1*0602	<31	106	<80	Th1
PR5-18	66	326-340	"	<31	<31	<16	Thp
PC1-13	68	336-350	DPA1*0202-DPB1*0501	<31	<31	<16	Thp
PB12-8	69	341-355	DQA1*0102-DQB1*0602	<31	3210	<16	Th1
PR5-12	69	341-355	"	<31	<31	2528	Th2
PR2-31	69	341-355	"	<31	<31	332	Th2
PB14-19	70	346-360	"	<31	3730	<16	Th1
PB13-38	70	346-360	"	<31	2020	<16	Th1

\* IL-4/IFN $\gamma$  >10 を Th2、IFN $\gamma$ /IL-4 >10 を Th1、その中間を Th0、リンフォカイン産生が認められない場合を Thp と定義する。



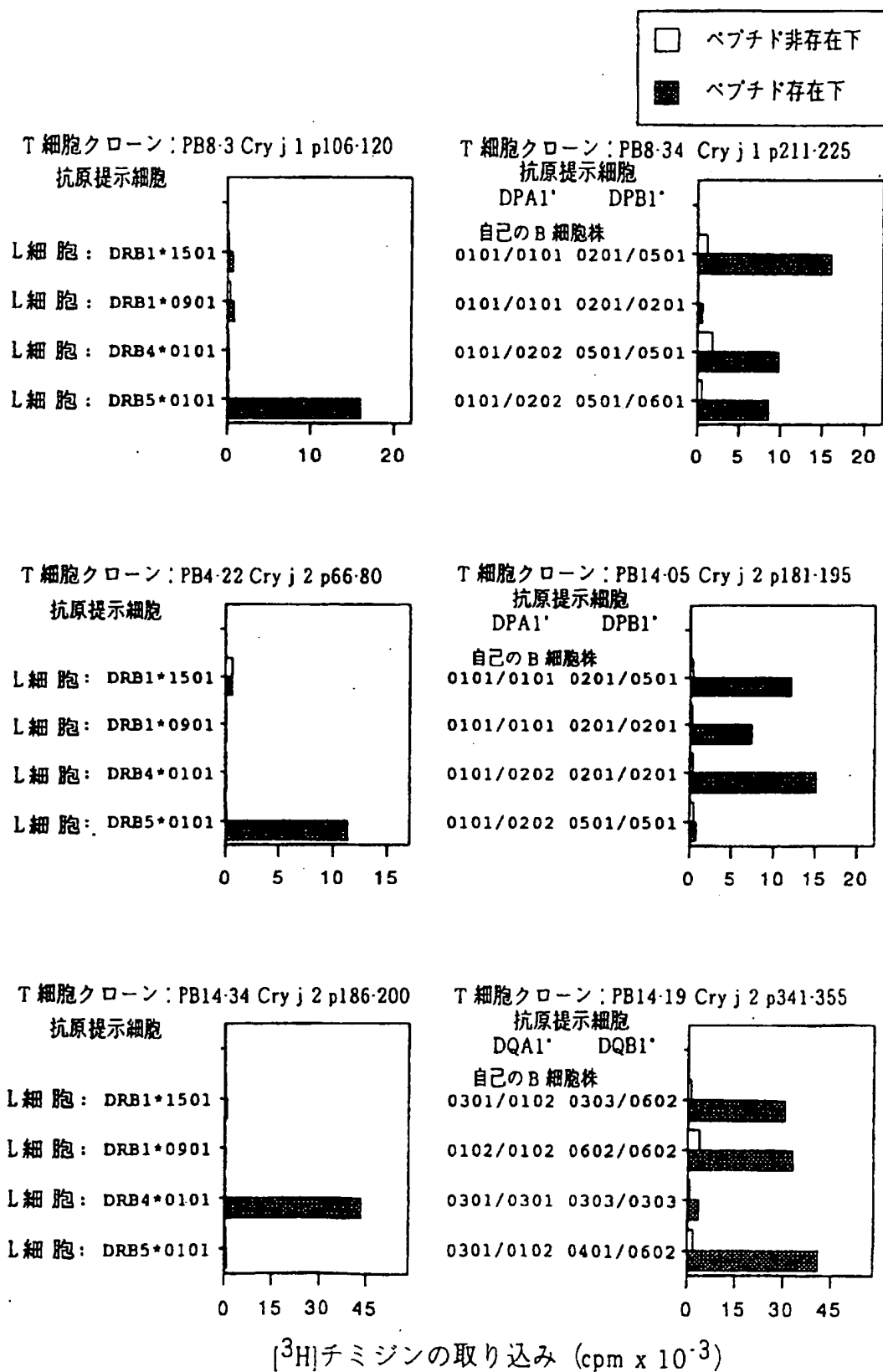
5/18

図 5



6 / 18

図 6



7 / 18

☒ 7

- a Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asn
- b Pro Cys Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly
- c Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys
- d Gly Ile Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile  
Gly Thr Gly
- e Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn  
Gly Tyr Phe

8/18

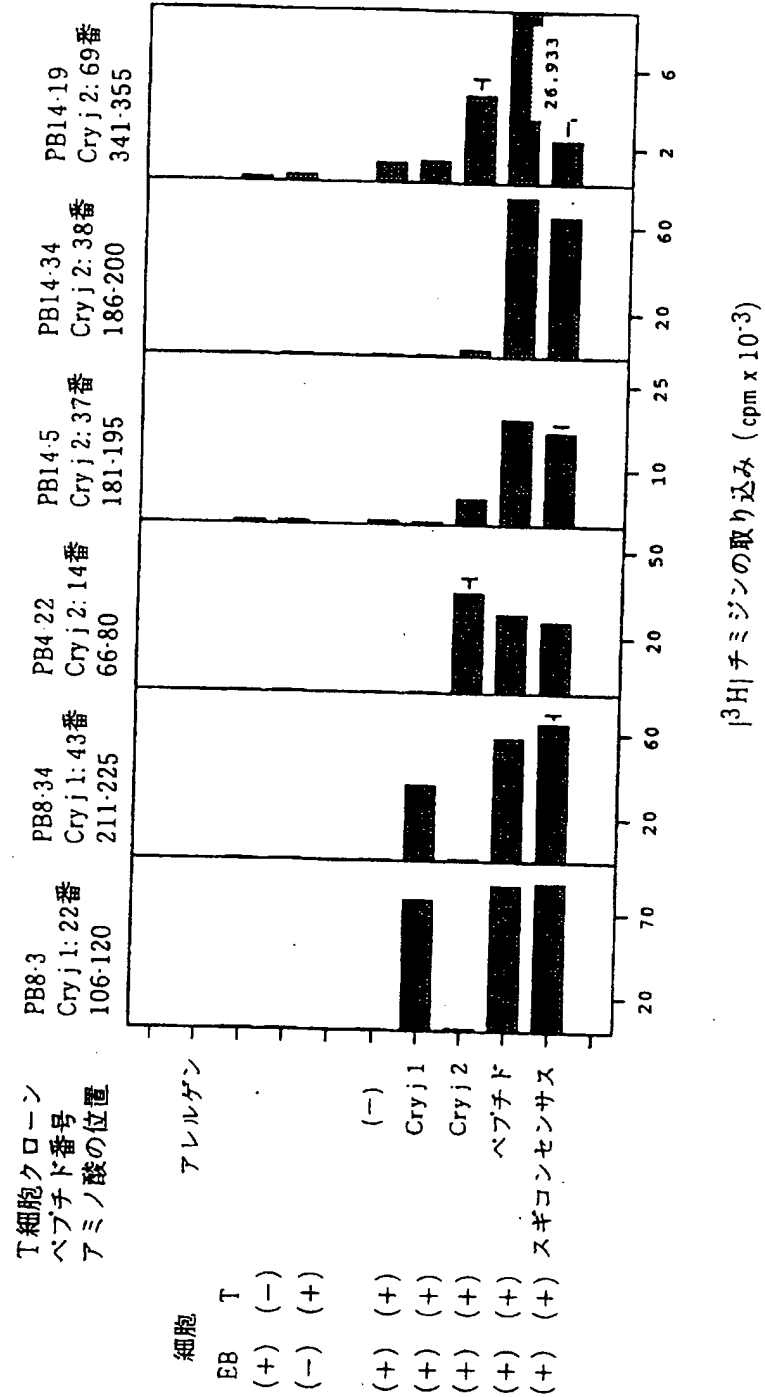
8

## ペプチド組成物（#1～#6）のヒトIg Eとの反応性

検体番号（血清）	ブラックス	スギ花粉抽出抗原	C.A.#1	C.A.#2	C.A.#3	C.A.#4	C.A.#5	C.A.#6
1	3	2105	5	4	3	4	4	4
2	3	1133	4	4	4	4	4	4
3	3	1126	3	3	3	4	4	4
4	3	1095	4	3	3	4	4	3
5	3	1047	3	3	3	3	3	3
6	3	1003	3	4	3	3	3	3
7	4	710	4	4	4	4	4	4
8	3	521	3	3	3	3	3	3
9	3	314	3	3	4	4	4	4
10	3	298	3	3	3	3	3	3
11	3	279	3	3	3	3	3	3
12	3	253	3	3	3	3	3	3
13	3	239	3	3	3	3	3	3
14	3	235	4	4	3	3	3	3
15	3	233	3	3	3	3	3	3
16	3	226	4	4	3	3	4	3
17	3	190	3	3	3	3	3	3
18	3	162	4	4	4	4	4	4
19	3	123	3	3	3	3	3	3
20	3	106	3	3	3	3	3	3
21	4	45	3	3	3	3	4	3
22	3	14	3	3	3	3	3	4
23	3	13	3	3	3	3	3	3
24	3	11	3	3	3	3	3	3
25	3	5	4	3	3	3	3	3
26	3	4	4	4	3	3	4	4
27	3	3	3	3	3	3	4	3
28	3	3	3	3	3	3	3	3
29	3	3	3	4	3	3	3	3
ウサギ抗ペプチド IgG	112	230	3754	3829	3769	3716	3841	3798

9/18

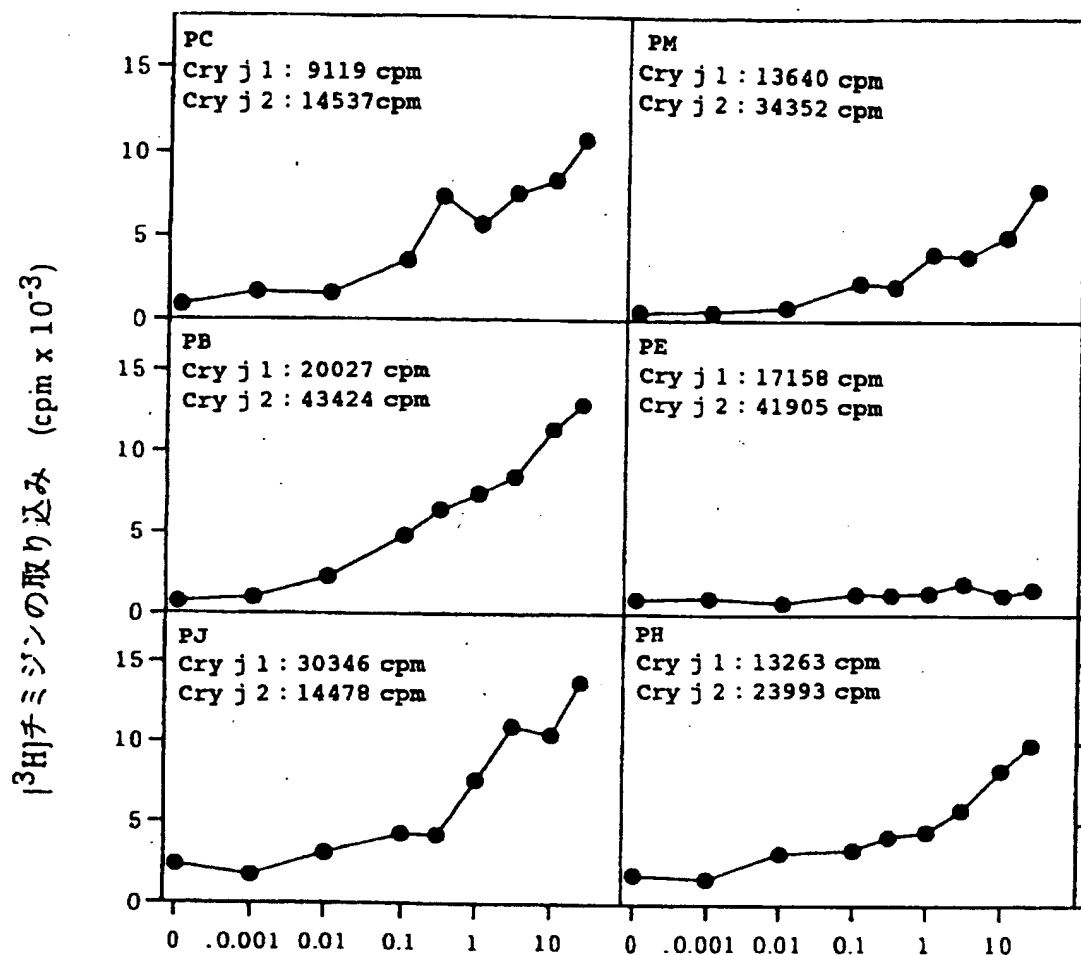
図 9



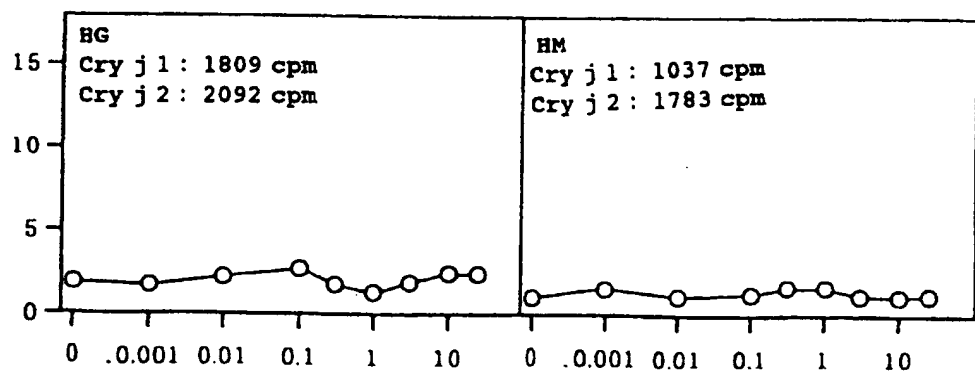
10/18

図 10

## スギ花粉症患者



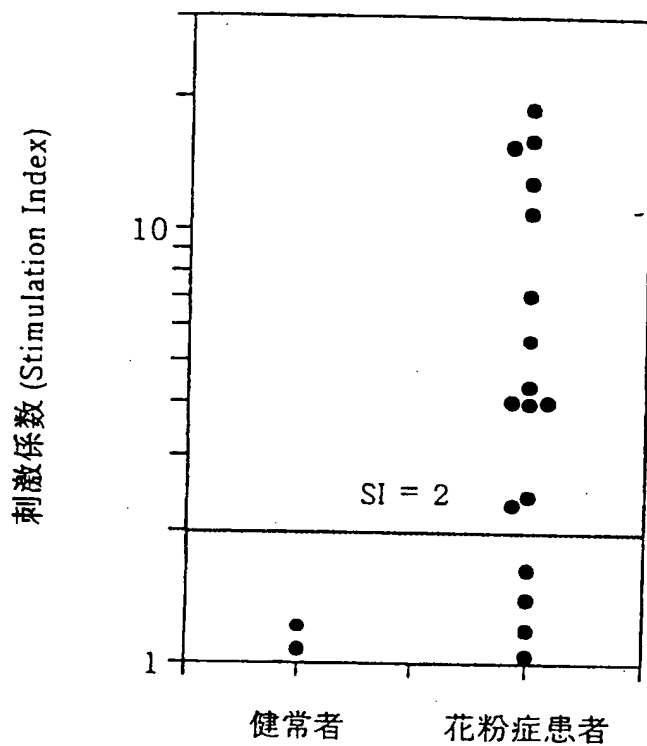
## 健常者

コンセンサスアレルゲン ( $\mu\text{g/ml}$ )

差替え用紙 (規則26)

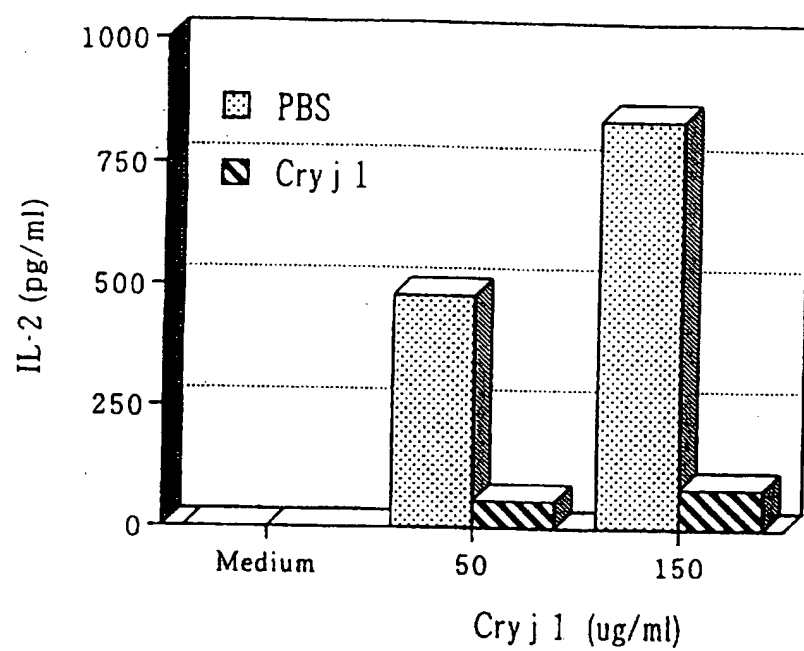
11/18

図 11



12/18

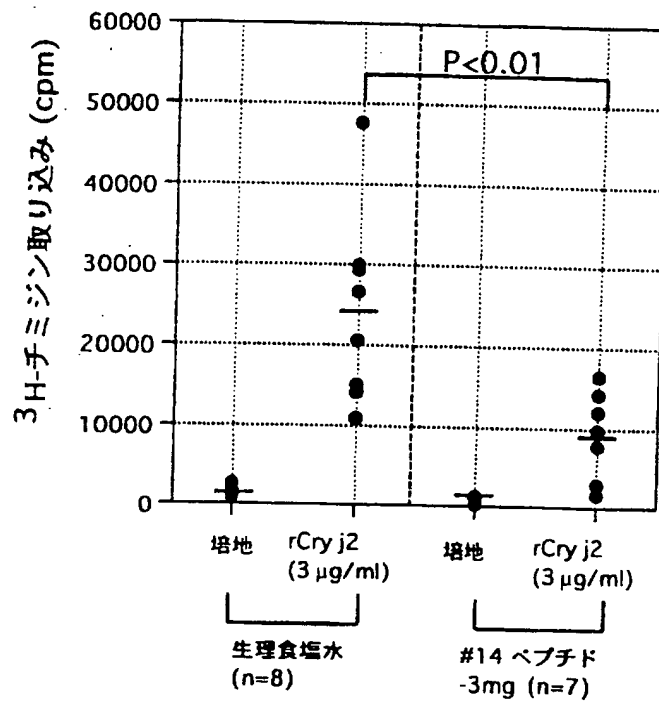
図 12





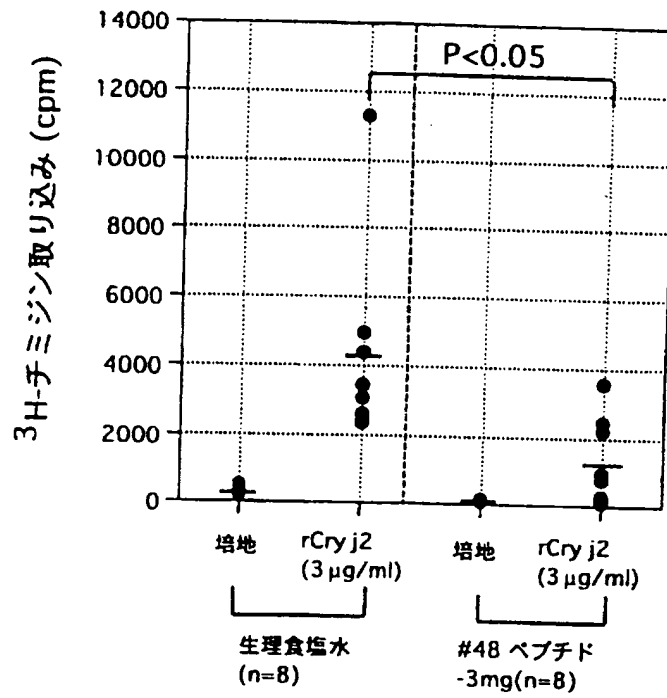
13/18

図 13



14 / 18

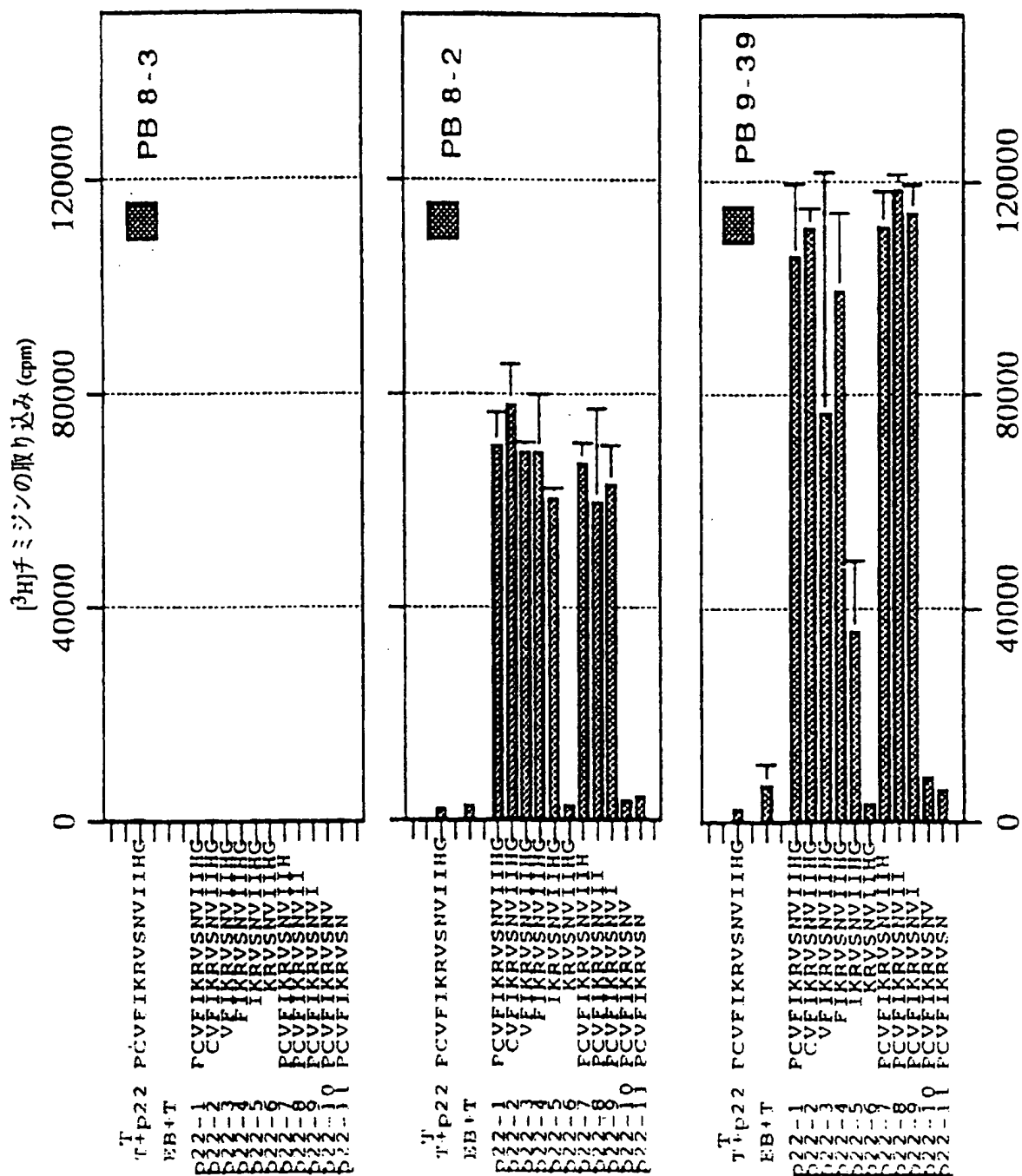
図 14



15/18

図 15

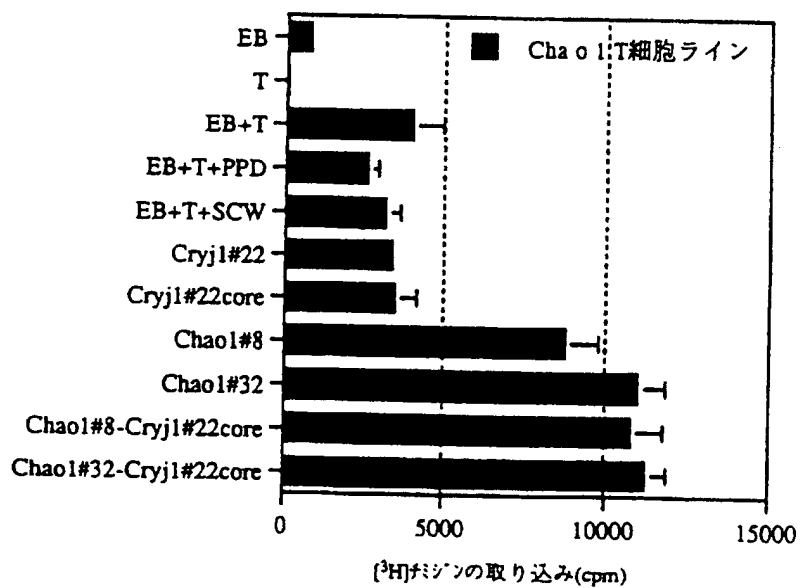
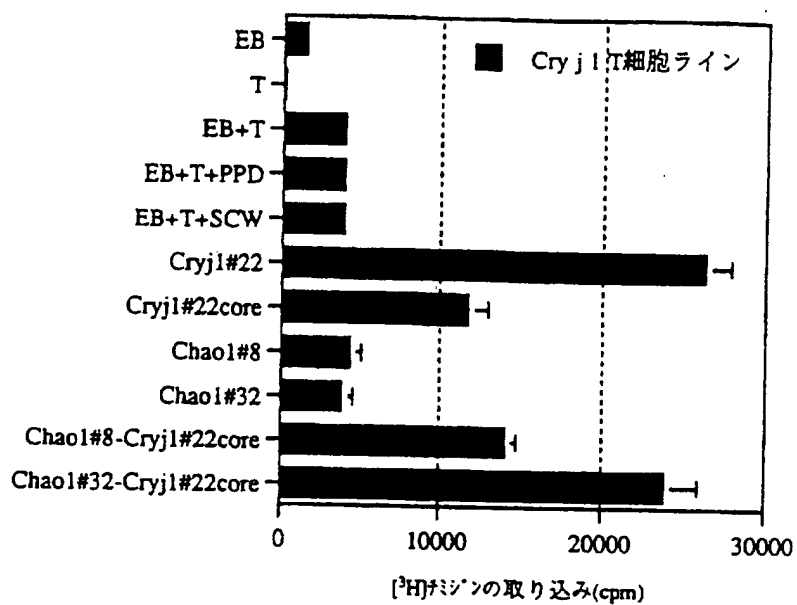
## T細胞クローン





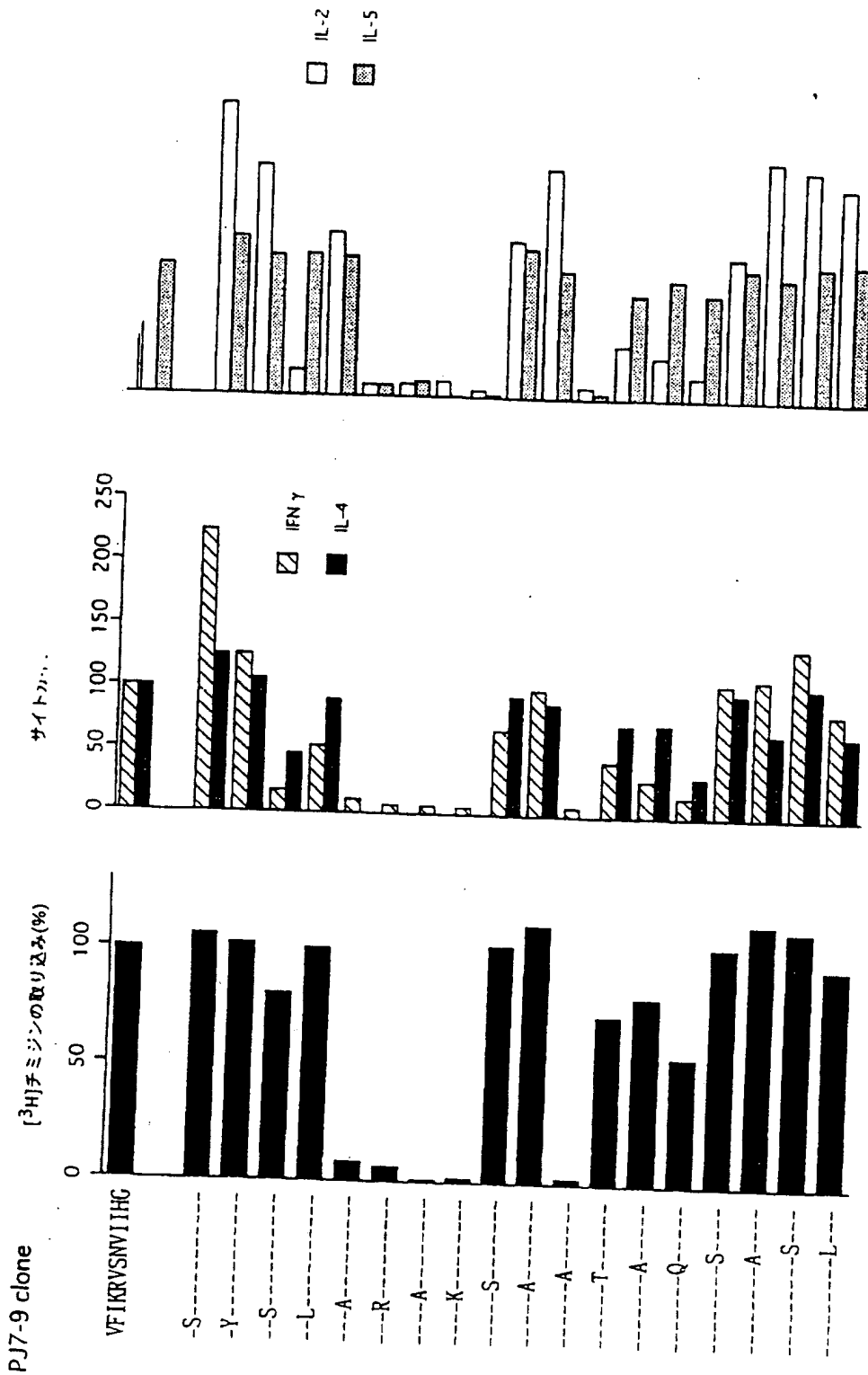
16/18

図 16



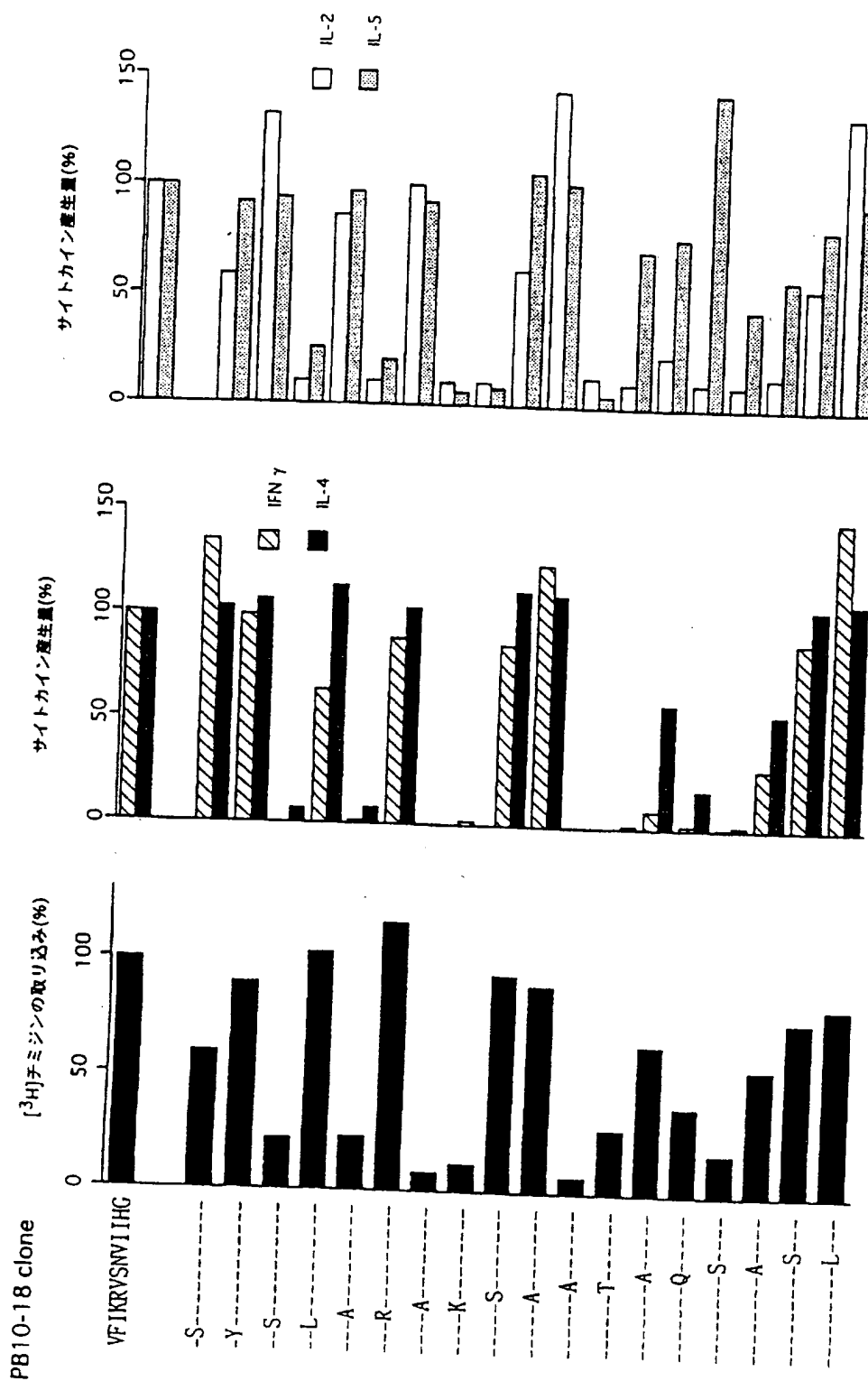
17/18

図 17



18/18

18



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00740

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> A61K39/35 // C07K14/725

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> A61K39/35 // C07K14/725

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	ROGERS, Bruce L. et al. "POTENTIAL THERAPEUTIC RECOMBINANT PROTEINS COMPRISED OF PEPTIDES CONTAINING RECOMBINED T CELL EPITOPE", Molecular Immunology, 1994, Vol. 31, No. 13, pp. 955-966	1-4, 6, 7 5, 8, 9
Y A	HIGINS, Julie A. et al., "Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of Dermatophagoides species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules", J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL., 1994, Vol. 93, No. 5, pp. 891-899	1-4, 6, 7 5, 8, 9
Y A	WO, 94/01560, A (Immologic Pharmaceutical Corp.), January 20, 1994 (20. 01. 94) & EP, 659214, A	1-4, 6, 7 5, 8, 9
Y A	KOMIYAMA, Naoki et al., "cDNA CLONING AND EXPRESSION OF Cry j II, THE SECOND MAJOR ALLERGEN OF JAPANESE CEDER POLLEN", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1994, Vol. 201, No. 2, pp. 1021-1028	1-4, 6, 7 5, 8, 9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 22, 1997 (22. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

June 3, 1997 (03. 06. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00740

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATSUNAGA, Youichi et al., "Participation of cathepsin B in processing of antigen presentation to MHC class II", FEBS LETTERS, 1993, Vol. 324, No. 3, pp. 325-330	5

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A 61K 39/35 // C 07K 14/725

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A 61K 39/35 // C 07K 14/725

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	ROGERS, Bruce L. et al, "POTENTIAL THERAPEUTIC RECOMBINANT PROTEINS COMPRISED OF PEPTIDES CONTAINING RECOMBINED T CELL EPITOPE", Molecular Immunology, 1994, Vol. 31, No. 13, pp. 955-966	1-4、6、7 5、8、9
Y A	HIGINS, Julie A. et al, "Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of Dermatophagoides species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules", J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL., 1994, Vol. 93, No. 5, pp. 891-899	1-4、6、7 5、8、9
Y A	WO, 94/01560, A (Immologic Pharmaceutical Corporation) 20. 01. 94 & EP, 659214, A	1-4、6、7 5、8、9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 05. 97

国際調査報告の発送日

03.06.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝原 下 浩



4 C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3453

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	KOMIYAMA, Naoki et al, "cDNA CLONING AND EXPRESSION OF Cry j II, THE SECOND MAJOR ALLERGEN OF JAPANESE CEDER POLLEN" , BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEACH COMMUNICATIONS, 1994, Vol.201, No.2, pp.1021-1028	1-4、6、7 5、8、9
A	MATSUNAGA, Youichi et al., "Participation of cathepsin B in processing of antigen presentation to MHC class II" , FEBS LETTERS, 1993, Vol.324, No.3, pp.325-330	5

SPECIFICATION

PEPTIDE-BASED IMMUNOTHERAPEUTIC AGENT  
FOR TREATING ALLERGIC DISEASES

5

Technical Field

The present invention relates to a multi-epitope peptide, which is useful for peptide-based immunotherapy of allergic diseases.

Background Art

10 Allergic diseases are defined to be functional disturbances caused by type I hypersensitivity (type I immune response mediated by IgE antibodies) or a kind of disease induced by the disturbance. The symptoms include pollinosis, bronchial asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, and anaphylactic shock. Pollinosis is a  
15 representative allergic disease. In Japan, approximately 10% of the population suffers from cedar pollinosis, and the number of the patients is still increasing. In America, 5 to 15% of the population suffers from short ragweed pollinosis. Pollinosis is a serious problem both socially and economically because there are many patients and  
20 they suffer from unbearable conditions such as itchiness of eyes, runny noses, sneezing, and nasal congestion. Moreover, once the patient acquires pollinosis, the disease manifests itself every year. An effective therapy for pollinosis has thus earnestly been sought.

To comprehend and treat allergic diseases, it is important  
25 to understand how a type I allergic response is developed. Current

studies focus on clarifying the initial reaction in the allergen-specific immune response, especially the mechanism of regulating a T cell-mediated allergic reaction. Initiation of an immune response to a foreign antigen including an allergen depends  
5 on antigen-presenting cells in the immune system. The antigen-presenting cells (i.e., B cells, macrophages, and dendritic cells) take up incoming foreign antigens, break them down to antigen peptides (T cell epitope peptides), put the fragments in a pocket consisting of  $\alpha$  and  $\beta$  chains of major histocompatibility complex  
10 (MHC) class II molecules (HLA class II in human), display the fragments on the cell surface, and thereby present the foreign antigens to antigen-specific CD4 positive helper T cells (Th cells). An HLA class II molecule consists of DR, DQ and DP molecules. The  $\alpha$ -chain of the DR molecule is encoded by the HLA-DRA gene, and the  $\beta$ -chain  
15 is encoded by the HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 or -DRB5 gene. The  $\alpha$ -chain of the DQ molecule is encoded by the HLA-DQA1 gene, and the  $\beta$ -chain is encoded by the HLA-DQB1 gene. The  $\alpha$ -chain of the DP molecule is encoded by the HLA-DPA1 gene, and the  $\beta$ -chain is encoded by the HLA-DPB1 gene. Each gene except for HLA-DRA contains many alleles.  
20 The pocket in which antigenic peptides are placed is highly polymorphic, and the structures differ slightly from each other. Because of this, the kind of antigenic peptides that bind to the pocket and are presented to T cells is restricted to that structure.

Once Th cells receive HLA class II-restricting antigen  
25 information via the T cell receptor (TCR), they are activated to

secrete various cytokines, by which they proliferate by themselves.

At the same time, the Th cells induce differentiation of B cells into plasma cells to induce antibody production. Depending upon the difference in the cytokine-producing pattern, the Th cells activated by antigen stimulation are classified into Th1 cells capable of producing interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and lymphotoxin (TNF- $\beta$ ); Th2 cells capable of producing IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13; and Th0 cells capable of producing both cytokines. The production of IgE antibody, which is a cause of allergy, is promoted by IL-4 and IL-13 but suppressed by IFN- $\gamma$ . That is, Th1 cells suppress IgE production, whereas Th2 cells promote IgE production. In other words, sensitization of allergy is determined by whether Th1 cells or Th2 cells function upon exposure of antigens. It is commonly known that Th2 cells predominantly function in the patients with allergy. Allergen-specific IgE antibodies adhere to peripheral basophil and tissue mast cells. The subsequent exposure of allergen results in cross-linking of the IgE antibody on the basophil or the mast cell via the allergen. This releases inflammatory mediators including histamine, prostaglandins, and leucotriene, thereby causing an immediate allergy response. In response to these inflammatory mediators, lymphocytes, monocytes, basophils, and eosinophils are localized in the inflammatory region of the tissue and result in the release of mediators that cause various reactions including disturbance and a late phase reaction.

One way to treat a particular allergy by antigen-specifically

suppressing IgE antibody production is hyposensitization therapy using an allergen protein molecule. Hyposensitization therapy can provide a long-term effect that cannot be achieved by chemotherapy, and hence, is the only treatment close to an effective therapy.

5 However, hyposensitization therapy is not always accepted as a general method for treating allergy, possibly because its mechanism and possible side effects (such as topical swelling or anaphylactic shock) remain unknown.

In place of hyposensitization therapy, a mechanism of

10 hyposensitization using a peptide antigen bearing a T cell epitope has been proposed. The peptide fragment carrying a T cell epitope on the allergen molecule used for this therapy contains no B cell epitope or, if any, is monovalent so that the peptide fails to cross-link an IgE receptor with high affinity on the mast cell. For these reasons,

15 patients administered the peptide fragment should not experience side effects such as anaphylactic shock. It is further known that when T cell epitope is given in vivo, T cells are antigen-specifically inactivated (anergy) (La Salle J.M. et al.: J. Exp. Med. 176: 177-186, 1992). It is reported that based on such a theoretical background,

20 hyposensitization using a peptide carrying major T cell epitopes of cat dander allergen Fel d1 was carried out in an experimental murine model, and T cell anergy was induced in vitro (Briner, T.J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7608-7612, 1994). Clinical trials on hyposensitization using this peptide are now under way

25 (Norman, P.S. et al.: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 154: 1623-1628,

1996; Simons, F.E. et al.: Int. Immunol. 8: 1937-1945, 1996).  
Hyposensitization therapy using such a peptide carrying the major  
T cell epitope on the allergen molecule is called "peptide-based  
immunotherapy" (or "peptide-based hyposensitization therapy").

5           As a standard for selecting T cell epitope peptides appropriate  
for the peptide-based immunotherapy, a positivity index (a mean T  
cell stimulation index multiplied by appearance frequency) is proposed  
in WO 94/01560. It is also reported that in peptide design, HLA  
haplotypic variations in a population of patients should be covered  
10 (Wallner, B.P. & Geftter M.L.: Allergy, 49: 302-308, 1994).

#### Disclosure of the Invention

Generally, allergic patients have specific IgE antibodies  
to each of two or more allergen molecules differing from each other.  
For a potent allergy therapy, it is important to develop a peptide-based  
15 immunotherapeutic agent effective for these patients. However, such  
an immunotherapeutic agent has not yet been developed. Even the idea  
of such an agent has never been published in any of the above literatures.

Accordingly, an objective of the present invention is to provide  
a peptide-based immunotherapeutic agent that is efficacious even  
20 for allergy patients sensitive to two or more different allergens.

Cedar pollen contains two major allergens, Cry j 1 (Yasueda,  
H. et al.: J. Allergy Clin. Immunol. 71: 77-86, 1983) and Cry j 2  
(Taniai, M. et al.: FEBS Letter 239: 329-332, 1988; Sakaguchi, M.  
et al.: Allergy 45: 309-312, 1990). More than 90% of the patients  
25 with cedar pollinosis possess specific IgE antibodies to Cry j 1



and Cry j 2; the remaining patients (slightly less than 10%) possess a specific IgE antibody to either Cry j 1 or Cry j 2 (Hashimoto, M. et al.: Clin. Exp. Allergy 25: 848-852, 1995). Use of one or more T cell epitopes from only Cry j 1 or Cry j 2 would be expected  
5 to be less effective since IgE from the patients is reactive to both Cry j 1 and Cry j 2. Thus, T cell epitopes from both Cry j 1 and Cry j 2 should be chosen to elevate the efficacy of the peptide-based immunotherapy for cedar pollinosis. Therefore, the present inventors prepared a multi-epitope peptide containing T cell epitopes of both  
10 Cry j 1 and Cry j 2 in the same molecule. They found that the multi-epitope peptide activated T cells of patients with pollinosis in vitro but did not react with IgE antibodies of the patients. They also found that an immune response was induced in vivo using mice. Based on these new findings, the inventors found that the  
15 multi-epitope peptide in this invention is effective as a peptide-based immunotherapeutic agent for patients with cedar pollinosis.

There are many cases of cedar pollinosis that also show clinical symptoms of Japanese cypress pollens. In view of this and based on the above invention, the present inventors prepared a multi-epitope  
20 peptide containing the T cell epitopes of Japanese cypress pollen allergen Cha o 1 (Japanese Patent Application No. Hei 8-153527) and the T cell epitopes of cedar pollen allergen Cry j 1 in the same molecule. The multi-epitope peptide activated T cells of both the patients with cedar pollinosis and the patients with Japanese cypress  
25 pollinosis, though these T cells do not react with each of the T

cell epitopes. The multi-epitope peptides can thus be designed for T cell epitopes derived from not only cedar and Japanese cypress pollen allergens but also other various allergens.

HLA haplotype was investigated in a group of patients  
5 (including different races) as a criterion for selecting T cell epitopes to design multi-epitopes that are effective for a broader range of patients. T cell epitope peptides were selected noting that those binding to HLA whose haplotype frequently appears in the population and those presented on different HLA class II molecules, not the  
10 same HLA class II molecule, should be selected. The thus-selected multi-epitope peptides were clarified to be effective for a wider range of patients.

The present invention includes the inventions described in each claim.

15 The present invention will be described below in view of designing of multi-epitope peptides effective for the patients sensitive to cedar pollens or Japanese cypress pollens or the patients sensitive to both pollens, but this invention applies to patients sensitive to other allergens as well. The technical concept of the  
20 present invention also applies to plant pollens such as short ragweed (Amb a 1, Amb a 2, Amb a 5, Amb t 5, Amb p 5), Dactylis glomerata (Dac g 2), and Lolium perenne (Lol p 1, Lol p 2, Lol p 3); tree pollens such as Alnus glutinosa (Aln g 1), birch tree or Betula verrucosa (Bet v 1, Bet v 2), mountain cedar (Jun s 1), and juniper tree (Jun  
25 v 1); and various other allergens not specifically described herein.

The "multi-epitope peptide" used herein means a peptide molecule prepared by linearly joining peptides containing T cell epitopes derived from different allergen molecules (sometimes referred to as an antigenic peptide or merely as a peptide). In this peptide, 5 a region that is cleaved in vivo is preferably inserted between the T cell epitope-containing peptides to minimize the occurrence of epitope sites that are newly recognized. The multi-epitope peptide is finally broken down to the respective antigenic peptides at the cleavage site. When administered, it can exhibit the effect comparable 10 to that of a mixture of these respective antigenic peptides. The cleavage site may take any structure so long as it undergoes cleavage in vivo. Examples of the cleavage site include an arginine dimer and a lysine dimer that are recognition sequences of cathepsin B, which is an enzyme localized in lysosome.

15        Designing of the multi-epitope peptide according to the present invention will be described with reference to cedar pollen allergens Cry j 1 and Cry j 2 as examples.

Peripheral lymphocytes collected from the patients with cedar pollinosis are stimulated by Cry j 1 or Cry j 2 to produce the T 20 cell line for individual patient. The T cell line is stimulated by an overlapping peptide consisting of about 15 amino acids, which covers the full-length primary structure of Cry j 1 (WO 94/01560) or Cry j 2 (Komiyama, N. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 201: 1201, 1994) to identify the antigenic peptides containing T cell 25 epitopes in the Cry j 1 or Cry j 2 sequence (Figs. 1 and 2).

Next, typing is performed for HLA class II molecules which bind to these antigenic peptides.

In humans, three different molecules, regions DR, DQ, and DP, exist as gene products of the HLA class II. This suggests that differentiation of T cells would be restricted by antigen-presenting molecules DR, DQ, and DP. The T cell clones established for each patient are used to determine by which locus-derived antigen-presenting molecules the antigenic peptide of Cry j 1 or Cry j 2 is presented. They also determine whether the T cells that have received antigenic peptide information via DR, DQ or DP molecules tend to be differentiated into Th1 cells or Th2 cells. Such a typing is performed using the T cell clone established for individual patients (Figs. 3 and 4).

Figures 3 and 4 clearly show that differentiation into Th1, Th2 or Th0 of the T cells stimulated by the antigenic peptide is not restricted by a specific epitope or a specific combination of HLA molecules. In selecting a peptide for designing the multi-epitope peptide of the present invention, any peptide can be a candidate for the antigenic peptide since any T cell epitope-containing peptide can stimulate T cells.

The criteria for selecting peptides to design the multi-epitope peptide of the present invention are as follows:

- (1) Peptides are selected in the order of a positivity index (WO 94/01560) (peptides having a positivity index of 100 or more should be selected).

(2) Peptides presented on HLA class II molecules that frequently appear as antigen-presenting molecules are selected.

(3) Where there is no significant difference in the positivity index, peptides presented by restriction molecules of different types  
5 are selected to enhance the effectiveness. Specifically, in selecting a T cell epitope of an allergen that causes a certain allergic disease, the HLA haplotype in a group of patients with the allergy is first examined, and a T cell epitope restricted by an HLA haplotype whose gene frequency is high in the population to which the patient group  
10 belongs is selected. This is then the best selection that should achieve the best effect in that patient group. However, the thus-selected T cell epitope may not be effective at all in other patient groups.

Taking HLA haplotype DPB1\*0501 as an example, it is assumed  
15 that this HLA haplotype is quite frequently observed in Japanese patients with a certain allergic disease, and the HLA haplotype-restricting T cell epitope is selected. The thus-selected peptide would hardly be effective for Northern American patients with the same allergy because the gene frequency of the HLA haplotype  
20 is as much as 39.0% in Japanese patients, whereas it is as little as 1.3% in white Americans and 0.8% in African Americans in Northern America. For Northern American patients, the HLA-DP restricting T cell epitope DPB1\*0401 (in Northern America, 30.2% for white American patients and 11.1% for African American patients; 4.8% for Japanese  
25 patients) should be selected. It is also important to select a peptide

presented on the antigen-presenting molecules differing in the locus level like DR, DQ, or DP; even though the loci are the same, it is important to select a peptide presented on the antigen-presenting molecules having different haplotypes.

5           In this case, the preferable epitope site contains no cysteine residue. When the epitope site contains a cysteine residue, the residue might bind non-specifically to HLA class II molecules. When immunized with an antigenic peptide containing a cysteine residue, the site that is originally not an antigen might be recognized as  
10 a new epitope. When such a peptide is recognized as an epitope, the cysteine-containing epitope is recognized by the peptide repeatedly through its second and third administrations, which may possibly cause side effects.

          Specific embodiments of designing the multi-epitope will  
15 be described below. According to the positivity index of Cry j 1 and Cry j 2 shown in Figs. 1 and 2, the T cell epitope of Cry j 1, Peptide No. 43 with amino acid residues at positions 211-225 (hereinafter abbreviated as p211-225) (restriction molecules DPA1\*0101 to DPB1\*0501) shows the highest positivity index and Peptide  
20 No. 22, p106-120 (restriction molecule DRB5\*0101) shows the second highest positivity index. These two peptides are selected as the antigenic peptides to be used in the multi-epitope peptide. Turning to Cry j 2, Peptide No. 14, p66-80 (restriction molecule DRB5\*0101) and Peptide No. 38, p186-190 (DRB4\*0101) show the highest positivity  
25 indexes. Likewise, these two peptides can be selected as the antigenic

peptides. Peptide No. 37, p181-195, located before Peptide No. 38 in Cry j 2 has a high positivity index of 280, but its restriction molecules are DPA1'0101 to DPB1'0201, which differ from the restriction molecule of Peptide No. 38. Since Peptide No. 37, p181-195 overlaps with Peptide No. 38, p186-200 by 10 residues, 5 residues from No. 37 are added ahead to No. 38. The thus-designed peptide can be selected as an HLA-DP restricting peptide. Peptides as selected above do not restrict DQ. Restriction molecules for Peptide No. 4, p16-30 of Cry j 1, are DQA1'0102 to DQB1'0602, but a cysteine residue is contained at the center of the epitope. Thus, Peptide No. 4 cannot be selected. In Cry j 2, p341-360, corresponding to Peptide Nos. 69-70, is a peptide presented on DQA1'0102 to DQB1'0602. Peptide No. 70 also contains cysteine, whereas T cells can be activated by only the cysteine-free Peptide No. 69. Thus, 12 residues, p344-355 (ISLKLTSKGKIAS), can be selected. Peptide No. 22, p106-120 of Cry j 1 contains cysteine at position 107. At least nine residues of p109-117 (FIKRVSNI) are required for determining the T cell epitope core sequence using a T cell clone. Thus, if Pro-Cys residues at p106-107 are removed, the remaining peptide can be used.

The antigen taken up into the antigen-presenting cells is degraded in lysosome. How the foreign proteins taken up into the antigen-presenting molecules are processed and how they are bound to HLA class II molecules are still unknown. However, it is reported that cathepsin B participates in the digestion of antigens in this complicated mechanism (Katsunuma, N.: Nihon Men-Eki Gakkai (Japanese

Society of Immunology)·25: 75, 1995).

With respect to several HLA class II types, an HLA-binding amino acid motif of the antigenic peptide has been determined. Binding to HLA class II molecules has specificity, but numerous antigenic peptides can bind to specific HLA class II molecules if the peptides meet a certain criterion (Rammensee, H. G. et al. Immunogenetics. 41: 178-228, 1995). For this reason, a newly recognized epitope site might possibly be created in the antigenic peptide-binding site.

To avoid this, the multi-epitope peptide should be designed so as to be cleaved into each of the antigenic peptides in the antigen-presenting cells. The peptide sequence recognized by cathepsin B is the Arg-Arg-hydrophobic sequence or the Lys-Lys-hydrophobic sequence. Therefore, Arg-Arg or Lys-Lys is added to the latter half of the peptide containing the epitope and, in the following epitope sequence, a hydrophobic amino acid sequence is placed after Arg-Arg or Lys-Lys.

Since Arg-Arg is inserted between the antigenic peptides, the order of the antigenic peptides in this specific embodiment is considered insignificant. When Arg is linked to the latter half of Peptide No. 14 of Cry j 2 (Fig. 2), however, Tyr at position 73 becomes a first anchor. The Arg residue added then becomes amino acid residue at position 9 in the peptide motif of DRB5\*0101 and serves as a second anchor. Thus, the Arg residue may be recognized as a new epitope. Therefore, this sequence should be located at the end of the multi-epitope peptide.



The thus-obtained multi-epitope peptide is shown as SEQ NO:

1. The restriction molecules for this multi-epitope are DRB4\*0101, DRB5\*0101, DPA1\*0101 - DPB1\*0201, DPA1\*0101 - DPB1\*0501, and DQA1\*0102 - DQB1\*0602. In The 11th International Histocompatibility Workshop, the frequency of these genes was calculated in the Japanese population (Tsuji, K. et al.: HLA 1991, vol. 1, 1992, Oxford University Press) and found to be 0.291 for DRB4\*0101, 0.056 for DRB5\*0101 (0.070 for DRB5\*0102), 0.208 for DPB1\*0201, 0.399 for DPB1\*0501, and 0.053 for DQB1\*0602 (0.204 for DQB1\*0601). Based on these data, the antigen frequency is calculated to be 0.50 for DRB4\*0101, 0.11 for DRB5\*0101 (0.14 for DRB5\*0102), 0.37 for DPB1\*0201, 0.64 for DPB1\*0501, (0.79 according to Hori et al.), and 0.10 for DQB1\*0602 (0.37 for DQB1\*0601).

Since DRB5\*0101 and DQB1\*0602 are regarded as identical due to the presence of linkage disequilibrium, the data of DRB5\*0101 is used for DQB1\*0602. The probability that the Japanese population carries both DPB1\*0201 and DPB1\*0501 or either one is calculated to be 0.85.

Similarly, the probability that the Japanese population carries both of DRB4\*0101 and DRB5\*0101 or either one is calculated to be 0.56. From these values, about 90% of patients are estimated to recognize more than one T cell epitope contained in the multi-epitope peptide of SEQ NO: 1. However, it is unclear whether the patients with these HLA types possess a T cell repertory capable of recognizing these epitope peptides presented on these restriction molecules. Furthermore, the number of epitopes that cause proliferation of T cells is unknown (two or more epitopes would be necessary). Thus,

the efficiency of the multi-epitope peptide might decrease. In practice, it is properly assumed to be approximately 77% based on the result of testing proliferation response of peripheral lymphocytes from 17 patients.

5           To increase the range of patients to be effectively treated, the multi-epitope peptide can also be designed to carry more T cell epitopes than described above. Examples of such multi-epitope peptides include one prepared by joining p213-225 and p108-120 of Cry j 1, p182-200 and p79-98 of Cry j 2, p80-95 of Cry j 1, and p66-80  
10 of Cry j 1, in this order (SEQ NO: 2), and one prepared by joining p213-225 and p108-120 of Cry j 1, p182-200 and p79-98 of Cry j 2, p67-95 of Cry j 1, and p238-251 and p66-80 of Cry j 2, in this order (SEQ NO: 3). These multi-epitope peptides are effective as peptide-based immunotherapeutic agents since the peptides stimulated  
15 all the peripheral lymphocyte samples from the 21 tested patients with cedar pollinosis but did not react with the IgE antibody of the patients. Developing this concept, the effectiveness can be improved by preparing a T cell epitope containing allergens of different species, e.g., both Japanese cypress pollen allergen and cedar pollen  
20 allergen, by the method described in Example 13.

          The present invention also includes modification of the antigenic peptide region used in the multi-epitope peptide to regulate the activity of T cells. The "modification" used herein means substitution, deletion, and insertion of at least one amino acid  
25 residue. Changes of properties of T cells imparted by amino acid

substitution in the antigenic peptide can be examined by known methods. For example, 1) a certain amino acid of the multi-epitope peptide of the present invention is substituted with an analogous amino acid, e.g., by substituting Asp with Glu, Asn with Gln, Lys with Arg, Phe with Tyr, Ile with Leu, Gly with Ala, and Thr with Ser, to produce analog peptides, which are compared with the original peptide in T cell proliferating ability or lymphokine-producing ability. Alternatively, 2) a certain amino acid of the multi-epitope peptide is substituted with a non-analogous amino acid, for example, by substituting a polar amino acid or a hydrophilic amino acid with a hydrophobic amino acid Ala, and a hydrophobic amino acid with a hydrophilic amino acid Ser, and the property of the modified peptide is compared to that of the original peptide. The present invention also includes the thus-prepared multi-epitope analog peptides that are immunologically equivalent to the multi-epitope peptide of the present invention in terms of the positivity index and the T cell activation ability.

Most T cells that react with the antigenic peptide derived from Cry j 1 or Cry j 2 possess the properties of Th2 and Th0 in combination (Figs. 3 and 4). BCG vaccine can potentiate the cellular immune activity to prevent infection with tubercle bacillus. To potentiate cellular immunity, T cells of Th1 type should be induced. It is reported that studies on the property of a human T cell clone with BCG inoculation revealed an increased level of Th1 type T cells (Matsushita, Sho, The 45th Japanese Association of Allergy, 836,

1995). According to Matsushita, there is a Th1 clone that is restricted by HLA-DR14 (DRB1\*1405) and that recognizes 84-100 amino acid sequence (EEYLILSARDVLAVVSK) of BCGa protein. If the HLA haplotype DPA1-DPB1\*0501-restricting T cell epitope that is possessed by more than 60% of Japanese population is selected (for example, Peptide No. 43 (p211-225)/KSMKVTVAFNQFGPN of Cry j 1 shown in Fig. 1), this peptide is bound to the 84-100 T cell epitope of tubercle bacillus BCGa protein restricted by DRB1\*1405. It is highly likely that the thus-prepared multi-epitope peptide EEYLILSARDVLAVVSKRRMKVTVAFNQFGPN would be quite efficacious for patients with cedar pollinosis carrying haplotype DRB1\*1405. The use of such a multi-epitope peptide would lead to production of Th1 lymphokines, especially IL-12, by a peptide derived from BCGa antigen. It is known in several cases in humans and mice that IL-12 has an activity contradictory to that of IL-4 and acts on T cells to induce differentiation of Th cells to Th1 (Manetti, R., et al.: J. Exp. Med., 177, 1199-1204, 1993; Wu, C., et al.: J. Immunol., 151, 1938-1949, 1993; Hsieh, C., et al.: Science, 260, 547-549, 1993). In particular, the experimental results by Manetti et al. indicate that a T cell clone specific to Der p1 antigen, a mite allergen, basically induces Th2 but induces Th1 or Th0 in the presence of IL-12. Thus, using the multi-epitope peptide prepared by joining a T cell epitope having Th1 induction activity to an allergen-reactive T cell epitope, T cells that are inherently induced to Th2 would be induced to Th1 or Th0.

When the peptide of the present invention containing at least one T cell epitope of Cryj1 and/or Cryj2 is subcutaneously administered to a mouse, which is then exposed to cedar pollen allergen, T cell anergy occurs (Figs. 13 and 14), and IL-2 production is significantly  
5 reduced as compared to the control group. It is reported that hyposensitization therapy reduces IL-2 in humans (J. Allergy Clin. Immunol. 76: 188, 1985). Furthermore, the multi-epitope peptide of the present invention can activate each of the peptide-constituting T cell clones to the T cell epitope peptides (Fig. 10) but does not  
10 react with IgE antibodies of the patients (Fig. 8). These results show that the multi-epitope peptide of the present invention induces immune tolerance against allergens and is effective as a peptide-based immunotherapeutic agent for allergic diseases. The multi-epitope peptide of the present invention may be administered together with  
15 pharmaceutically acceptable carriers or diluents. The effective dose of the multi-epitope peptide may vary depending upon sensitivity to cedar pollen allergen, age, sex, and the body weight of the patients and other factors such as ability of a peptide to induce immune response in the patients.

20 The multi-epitope peptide may be administered in a simple manner using an administration route including injection (subcutaneous or intravenous), rhinenchysis, instillation, oral administration, inhalation, percutaneous administration, etc.

The one-letter notation for amino acids used in the  
25 specification and the sequence listing follows the definition

prescribed by IUPAC, Commission on Biochemical Nomenclature (cf., Biochemical Dictionary, 2nd ed., 1468, Table 1.1).

Brief Description of Drawings

Figure 1 shows a mean stimulation index, frequency of  
5 appearance, and a positivity index (mean stimulation index multiplied by frequency of appearance) of the cell line derived from the patients with cedar pollinosis, against Cry j 1 overlapping peptides.

Figure 2 shows a mean stimulation index, frequency of  
10 appearance, and a positivity index (mean stimulation index multiplied by frequency of appearance) of the cell line derived from the patients with cedar pollinosis, against Cry j 2 overlapping peptides.

Figure 3 shows the Th type of the T cell clones that recognize complexes between the Cry j 1 antigenic peptides and HLA class II  
15 molecules as well as the Th types of the HLA class II molecules.

Figure 4 shows the Th type of T cell clones that recognize complexes between the Cry j 2 antigenic peptides and HLA class II molecules as well as the Th types of the HLA class II molecules.

Figure 5 shows the results of identifying HLA class II molecules  
20 capable of binding to an antigenic peptide at the locus level (DR, DQ, and DP).

Figure 6 shows the results of identifying HLA class II molecules capable of binding to an antigenic peptide at an allelic level of each locus.

25 Figure 7 shows the amino acid sequences used in the

multi-epitope peptide. In this figure, Peptides a and b correspond to Peptide Nos. 43 and 22 of Cry j 1, respectively; Peptide c corresponds to No. 14 of Cry j 2; and Peptides d and e correspond to Peptide Nos. 37-38 (p181-200) and Nos. 69-71 (p346-365), respectively.

5        Figure 8 shows the reactivity of the multi-epitope peptides designated as C.A.#1, C.A.#2, C.A.#3, C.A.#4, C.A.#5 and C.A.#6 with human IgE.

Figure 9 shows the results of recognizing the T cell epitopes contained in the multi-epitope peptide C.A.#4 by T cell clones.

10        Figure 10 shows the ability of lymphocyte proliferation response of the peripheral lymphocytes of the patients with cedar pollinosis and healthy subjects induced by stimulation with the multi-epitope peptide (SEQ NO: 1) in various concentrations.

Figure 11 shows the ability of proliferation response of  
15 the peripheral lymphocytes of two healthy subjects and 17 patients with cedar pollinosis induced by stimulation with the multi-epitope peptide SEQ NO: 1.

Figure 12 shows the immune tolerance induced by administration of cedar pollen allergen Cry j 1 to CBF1 mice.

20        Figure 13 shows the immune tolerance induced by administration of Peptide No. 14 (p66-80) of Cry j 2 to CBF1 mice.

Figure 14 shows the immune tolerance induced by administration of Peptide No. 48 (p236-250) of Cry j 2 to CBF1 mice.

Figure 15 shows core amino acid sequencing of Peptide No.  
25 22 (p106-120) of Cry j 1.

Figure 16 shows the reactivity of T cell lines of the patients with cedar pollinosis and the patients with *hinoki* pollinosis with the multi-epitope peptide prepared by binding a cedar pollen-specific T cell epitope peptide to a Japanese cypress pollen-specific T cell epitope peptide.

Figure 17 shows the proliferation response of T cell clone PJ7-9 to an amino acid-substituted analog peptide of Cry j 1 #22 core peptide and the amount of cytokine subsequently produced.

Figure 18 shows the proliferation response of T cell clone PB10-18 to the above-described analog peptide and the amount of cytokine subsequently produced.

#### Best Mode for Implementing the Invention

##### Example 1

##### Identifying T cell epitope of Cry j 1 and Cry j 2 using T cell line

Peripheral lymphocytes from 18 patients with cedar pollinosis were stimulated by cedar pollen allergen Cry j 1 or Cry j 2 to establish the T cell line of each patient capable of specifically recognizing the respective allergen.

A mixture of  $5 \times 10^4$  cells of the autologous B cell line treated with mitomycin C,  $2 \mu\text{M}$  of an overlapping peptide, and  $2 \times 10^4$  cells of the T cell line was incubated for 2 days in RPMI-1640 medium supplemented with 0.2 ml of 15% serum on a 96-well culture plate. After  $0.5 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] thymidine was added to the medium, incubation was continued for a further 18 hours. After the cells were harvested on a glass filter using a cell harvester, the level of [ $^3\text{H}$ ] thymidine



taken up into the cells was determined with a liquid scintillation counter. If the stimulation index is 2 or more, we consider that the added peptide is recognized as an antigenic peptide. The stimulation index means a value obtained by dividing the level of  
5 [3H] thymidine taken up into the cells when the peptide was added by the level of [3H] thymidine taken up into the cells when no peptide was added.

For Cry j 1, the number of T cell epitopes on the Cry j 1 molecule that each patient recognized was on average 9.8 and ranged  
10 from 4 to 15. For Cry j 2, the number of T cell epitopes was on average 8.7 and ranged from 2 to 13. Cry j 1 consists of 353 amino acids, and, Cry j 2, 379 amino acids. Therefore, it was estimated that 2.3 to 2.8 T cell epitopes are present per 100 amino acid residues.

The HLA class II type is considered to vary in every patient.  
15 It is thus assumed that a T cell epitope to be recognized would vary depending on the HLA class II type. For this reason, the antigenic peptide that the patients recognized was mapped for the individual patient. The results indicate that the epitopes on the Cry j 1 and Cry j 2 molecules differ depending on the patient. On the allergen  
20 molecule, there are both regions that can be readily recognized and regions that can hardly be recognized, as a T cell epitope, depending on individuals. Moreover, since the proliferation rate of T cells varies depending on a T cell epitope, the epitope map alone makes it difficult to determine what antigenic peptide should be chosen  
25 to design the multi-epitope peptide. Therefore, eighteen patients

were further examined with respect to the antigenic peptide which showed a stimulation index of 2 or more. A mean stimulation index of the antigenic peptide was calculated and multiplied by the rate of patients carrying the antigenic peptide (frequency in appearance) to calculate the "positivity index" which shows the predominant order for the respective epitopes (cf. WO 94/01560).

The results are shown in Figs. 1 and 2. In Cry j 1, Peptide No. 43 (p211-225) shows the highest positivity index, 679, which is followed by the second highest Peptide No. 22 with a positivity index of 578 and Peptide No. 4 with a positivity index of 373. In Cry j 2, Peptide No. 14 shows the highest positivity index (709).

Peptide No. 38 with a positivity index of 680 and Peptide No. 48 with a positivity index of 370 then follow. One antigenic peptide having a high positivity index may be selected and used for the peptide-based immunotherapy. However, even for the highest appearance frequency, the effect can be theoretically expected in only 72% of the patients, and the actual efficiency would be lower. To increase the efficiency, it is necessary to use numerous T cell epitopes in combination. In this case, T cell epitopes with a high positivity index are chosen as candidates. However, just using epitopes with a high positivity index alone cannot increase the efficiency if HLA class II molecules presenting these epitopes as antigens are the same. It is thus necessary to identify the type of HLA class II molecules presenting T cell epitope peptides.

Example 2

Identifying T cell epitope peptide recognized by T cell clone

Two patients, Patient B (PB) and Patient J (PJ), who recognize Peptide Nos. 43 and 22 showing a high positivity index in Cry j 1 and three patients, PB, Patient C (PC), and Patient R (PR), who recognize  
5 Peptide Nos. 14, 38, 48, and 69 showing a high positivity index in Cry j 2 were selected from the eighteen patients with cedar pollinosis. Peripheral lymphocytes from these patients with cedar pollinosis were stimulated by Cry j 1 or Cry j 2 to establish T cell clones capable of recognizing Cry j 1 or Cry j 2. The types of HLA class  
10 I and class II molecules of the four patients are shown below.

PB: A2/24 - B39/55 - Cw7/w3 - DRB1\*1501/0901 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101,  
DQA1\*0102/0301 - DQB1\*0602/0303 - DPA1\*0101/0101 -  
DPB1\*0501/0201;  
PJ: A24/- - B61/51 - Cw3/- - DRB1\*1501/0802 - DRB5\*0101,  
15 DQA1\*0102/0401 - DQB1\*0602/0402 - DPA1\*-/- - DPB1\*0501/0402;  
PC: A-2/2 - B54/51 - Cw1/-, DRB1\*0405/1501 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101  
- DQA1\*0301/0102 - DQB1\*0401/0602 - DPA1\*0202/0202 -  
DPB1\*0201/0501;  
PR: A-11/- - B60/35 - Cw7/w3 - DRB1\*0901/1501 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101  
20 - DQA1\*0301/0102 - DQB1\*0303/0602 - DPA1\*01/0202 -  
DPB1\*0201/0201.

Thirty-five T cell clones in total that specifically recognize Cry j 1 were established from the peripheral lymphocytes derived  
25 from PB, and 14 similar T cell clones from PJ. Likewise, 31 T cell

clones, 10 T cell clones, and 17 T cell clones in total that specifically recognize Cry j 2 were established from the peripheral lymphocytes derived from PB, PC and PR, respectively. Since these T cell clones were all CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, TCR $\alpha$   $\beta$ <sup>+</sup> and TCR $\gamma$   $\delta$ <sup>-</sup>, the restriction molecules were found to be HLA class II molecules. A mixture of 5 x 10<sup>4</sup> cells of the autologous B cell line previously treated with mitomycin C, 2  $\mu$ M of an overlapping peptide, and 2 x 10<sup>4</sup> cells of the T cell clone was incubated for 2 days in RPMI-1640 medium supplemented with 0.2 ml of 15% serum on a 96-well micro culture plate. After 0.5  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H] thymidine was added to the medium, incubation was continued for a further 18 hours. After the cells were harvested on a glass filter using a cell harvester, the level of [<sup>3</sup>H] thymidine taken up into the cells was determined using a liquid scintillation counter. By this procedure, the T cell epitope recognized by each of the T cell clones was identified.

In the T cell clones that recognized Cry j 1, 69% (34/49) showed a proliferation response by stimulation with the peptides and, as a result, the epitopes were identified. Similarly, the antigenic peptide could be identified in 69% (40/58) out of the T cell clones which recognized Cry j 2. The T cell clones capable of specifically recognizing Cry j 1 recognized Peptide Nos. 4, 13, 19, 22, 30, 31, 39, 43, 51, and 66, and the T cell clone capable of specifically recognizing Cry j 2 recognized Peptide Nos. 4, 8, 14, 17, 31, 37, 38, 48, 65, 66, 68, 69, and 70. The results are summarized in Figs. 3 and 4.

### Example 3

#### Identifying HLA class II restriction molecules at the locus level

HLA class II restriction molecules were identified at the locus level by adding a monoclonal antibody capable of specifically reacting with DR, DQ or DP of HLA class II molecules to the proliferation response system of the T cell clones established in Example 2, thereby inhibiting the proliferation response of T cells.

A mixture of  $2 \times 10^4$  cells of the autologous B cell line previously treated with mitomycin C;  $2 \mu\text{M}$  of an overlapping peptide;  $3 \mu\text{g/ml}$  of anti-DR, -DQ or -DP monoclonal antibody (manufactured by Becton Dickinson Inc.); and  $2 \times 10^4$  cells of the T cell clone was incubated for 2 days in RPMI-1640 medium supplemented with 0.2 ml of 15% serum on a 96-well micro culture plate. After  $0.5 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] thymidine was added to the medium, incubation was continued for a further 18 hours. After the cells were harvested on a glass filter using a cell harvester, the level of [ $^3\text{H}$ ] thymidine taken up into the cells was determined using a liquid scintillation counter. The results shown in Fig. 5 indicate that the restriction molecule of the Cry j 1 p106-120, Cry j 2 p66-80 and Cry j 2 p186-200 peptides was DR; that of the Cry j 2 p341-355 peptide was DQ; and that of the Cry j 1 p211-225 and Cry j 2 p181-195 was DP. The restriction molecules of other T cell clones were analyzed in the same manner (cf. Figs. 3 and 4).

### Example 4

#### Identifying the HLA class II restriction molecules

HLA class II restriction molecules can be identified using

the T cell clones whose restriction molecules were identified at the HLA class II locus level and, as antigen-presenting cells, mouse L-cells transfected with each type for DR and B cell line having the same haplotype for DQ or DP.

5           A mixture of  $5 \times 10^4$  mouse L cells previously treated with mitomycin C or the B cell line coincident in haplotype;  $2 \mu\text{M}$  of an overlapping peptide;  $3 \mu\text{g/ml}$  of anti-DR, -DQ or -DP monoclonal antibody (manufactured by Becton-Dickinson Inc.); and  $2 \times 10^4$  cells of the T cell clone was incubated for 2 days in RPMI-1640 medium supplemented  
10 with 0.2 ml of 15% serum on a 96-well micro culture plate. After  $0.5 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] thymidine was added to the medium, incubation was continued for a further 18 hours. After the cells were harvested on a glass filter using a cell harvester, the level of [ $^3\text{H}$ ] thymidine taken up into the cells was determined using a liquid scintillation counter.

15           The restriction molecules can be identified by observing the proliferation response of the T cell clones. The Cry j 1 p106-120 peptide-presenting restriction molecule was DRB5'0101, the Cry j 1 p211-225 peptide-presenting restriction molecule was DPA1'0101 - DPB1'0501, the Cry j 2 p66-80 peptide-presenting restriction molecule  
20 was DRB5'0101, the Cry j 2 p181-195 peptide-presenting restriction molecules was DPA1'0101 - PDB1'0201, the Cry j 2 p186-200 peptide-presenting restriction molecules was DRB4'0101, and the Cry j 2 p341-355 peptide-presenting restriction molecules was DQA1'0102 - DQB1'0602 (Fig. 6). The results obtained with the other epitope  
25 sites are shown in Figs. 3 and 4.

Example 5

Identifying the Th type of T cell clone

Th2 cells are considered to participate in the development of allergy. The current level of investigations has not completely clarified if differentiation of T cells into Th1 or Th2 cells is restricted, after antigen stimulation, by a specific epitope peptide or on a HLA class II locus level. When Th2 cells are predominantly induced after stimulation with a peptide, it is highly likely that administration of the peptide will worsen the cedar pollinosis. The T cell clones prepared in Example 2 were stimulated with the epitope peptide recognized by T cells. Th type was determined by measuring the amount of IL-2, IL-4, and IFN- $\gamma$  produced.

A mixture of  $1 \times 10^5$  cells of the autologous B cell line previously treated with mitomycin C,  $2 \mu\text{M}$  of the epitope peptide, and  $5 \times 10^5$  cells of the T cell clone was incubated for 24 hours in RPMI-1640 medium supplemented with 1 ml of 10% human serum on a 24-well micro culture plate. The cells were precipitated by centrifugation to obtain the culture supernatant. IL-2, IL-4, and IFN- $\gamma$  in the supernatant were determined using the respective ELISA kits commercially available [for IL-2, manufactured by R & D Inc.; for IL-4, manufactured by Medgenics Inc.; and for IFN- $\gamma$ , manufactured by Otsuka Assay Research Laboratories).

The amounts of IL-2, IL-4, and IFN- $\gamma$  produced by each T cell clone are shown in Figs. 3 and 4. The T cell clones which recognize Cry j 1 were twelve Th2, one Th1, and sixteen Th0 cells, showing

that there were more Th2 clones than Th1 clones. In contrast, the T cell clones which recognize Cry j 2 were ten Th2, eight Th1, and eight Th0 cells, showing that the number of Th2 clones was roughly equal to the number of Th1 clones. A comparison of T cell epitopes  
5 recognized by the respective T cell clones, restriction molecules, and Th type reveals that the Th2, Th1 or Th0 type varies depending upon each T cell clone. Both Th2 cells and Th1 cells are found in a few T cell clones which recognize the same epitope and the same antigen-presenting molecule. These results indicate that after  
10 stimulation with Cry j 1 or Cry j 2, differentiation of T cells into Th2, Th1 or Th0 is not controlled by the combination of a specific T cell epitope and a specific restriction molecule. In other words, all of the peptides carrying the T cell epitope sites can be candidates for the multi-epitope peptide of the present invention.

15 Example 6

Preparing the multi-epitope peptide

Identifying the IgE antibody epitope sites present on Cry j 1 and Cry j 2 reveals that Cry j 1 lacks an IgE epitope capable of recognizing the primary structure and at least four IgE antibody  
20 epitope sites are present on Cry j 2. However, these IgE antibody epitope sites differ from the epitope sites of T cells. Based on this finding, the peptides shown in Fig. 7 were selected from the T cell epitopes of Cry j 1 and Cry j 2.

Peptides a and b shown in Fig. 7 correspond respectively  
25 to PeptideNos. 43 and 22 of Cry j 1 shown in Fig. 1, Peptide c corresponds



to No. 14 of Cry j 2 shown in Fig. 2, and Peptides d and e respectively consist of a part of the amino acids 37-38 and 69-71 of Cry j 2 shown in Fig. 2.

These six peptides were joined to each other in tandem to  
5 prepare the multi-epitope peptide of the present invention. In this case, the two peptides a and b were joined in the order of a and then b; the remaining three peptides (Peptides c, d and e) were joined at random. The sequence Arg-Arg was inserted between the peptides.

Thus, the following six multi-epitope peptides were produced:

- 10 C.A.#1. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e  
C.A.#2. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d  
C.A.#3. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e  
C.A.#4. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c  
C.A.#5. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d  
15 C.A.#6. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c

#### Example 7

#### Reactivity of the multi-epitope peptides with human IgE antibody

The six multi-epitope peptides (C.A.#1 through C.A.#6)  
obtained in Example 6 were dissolved in 0.2 M acetate buffer solution  
20 (pH 4.5). The solution was dispensed in quantities of 0.1 ml/well in a black plate (manufactured by Dainihon Pharmaceutical Co., Ltd.) then allowed to stand at 4°C overnight. After the antigen solution was removed, the wells were washed three times with a washing solution and the serum (4-fold dilution) from 29 patients with cedar pollinosis  
25 and healthy subjects were each added to separate wells. The system

was then reacted at 37°C for 4 hours. After the sera were removed, the wells were washed three times with a washing solution then reacted with anti-human IgE antibody (made by Pharmacia Inc.) at room temperature overnight. After washing three times with a washing  
5 solution, a substrate solution containing 0.1 mM 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside/0.01 M phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NaN<sub>3</sub> and 0.1% BSA was added, and the solution was incubated at 37°C for 2 hours. A solution of 0.1 M glycine/NaOH (pH 10.3) was added to the wells to terminate the reaction. Fluorescent  
10 intensity was measured using a fluorophotometer (Labsystems). For positive control to each multi-epitope peptide, biotin-labeled rabbit anti-d epitope IgG and peroxidase-labeled streptoavidin (made by Pierce Inc.) were reacted.

As a result, all sera from the 29 human subjects exhibited  
15 a fluorescent intensity of 3 to 5 to all of the six multi-epitope peptides (C.A.#1 through #6) (blank: 3 or 4). In contrast, when the antigen Cry j 1 extracted and purified from cedar pollen was used, a fluorescent intensity of 1,000 or more was noted in six subjects, 100 or more in 14 subjects, 10 or more in four subjects and nine  
20 or less in five subjects. In contrast, rabbit anti-d epitope peptide IgG exhibited a fluorescent intensity of 3,000 or more in response to the six consensus allergens (blank: 112; 230 to Cry j 1 allergen). These results reveal that the order of joining each epitope site in the multi-epitope peptide does not affect the reactivity with  
25 human IgE antibody (Fig. 8).

Example 8

Recognizing the T cell epitopes in the multi-epitope peptide

The antigenic peptide constituting the multi-epitope peptide C.A.#4 obtained in Example 6 was examined to determine if the antigenic peptide actually functions as a T cell epitope.

On a 96-well micro culture plate, a mixture of  $5 \times 10^4$  cells of the autologous B cell line previously treated with mitomycin C and  $2 \times 10^4$  cells of the T cell clone was incubated for 2 days in 0.2 ml 15% serum-supplemented RPMI-1640 medium, together with, as an antigen, either  $50 \mu\text{g/ml}$  of Cry j 1 and  $2 \mu\text{g/ml}$  of Cry j 2, each antigenic peptide constituting the multi-epitope peptide C.A.#4 or  $10 \mu\text{g/ml}$  C.A.#4 multi-epitope peptide produced by gene expression.

After  $0.5 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] thymidine was added to the medium, incubation was continued for a further 16 hours. After the cells were harvested on a glass filter using a cell harvester, the level of [ $^3\text{H}$ ] thymidine taken up into the cells was determined using a liquid scintillation counter. The results are shown in Fig. 9.

T cell clone PB8-3 that recognizes Cry j 1 p106-120, T cell clone PB8-34 that recognizes Cry j 1 p211-225, T cell clone PB4-22 that recognizes Cry j 2 p66-80, T cell clone PB14-5 that recognizes Cry j 2 p181-195, and T cell clone PB14-3 that recognizes Cry j 2 p186-200, all react well with the antigenic peptide. When the multi-epitope peptide was used, the T cell clones are responsive to proliferation at a level comparable to that of each of the peptides. The proliferation response of T cell clone PB14-19 that recognizes

Cry j 2 p341-355 to the multi-epitope peptide stimulation was somewhat weak.

Those results indicate that the antigenic peptides contained in the multi-epitope peptide function well as the epitopes and retain the T cell activating ability.

#### Example 9

#### Proliferation response of the peripheral lymphocytes from patients with cedar pollinosis induced by multi-epitope peptides

Since the multi-epitope peptide contains T cell epitope sites, it is necessary to induce proliferation response to peripheral lymphocytes upon applying peptide-based immunotherapy. The inventors thus examined if proliferation response is observed by stimulating peripheral lymphocytes with the multi-epitope peptide.

Peripheral lymphocytes derived from the patients with cedar pollinosis or from healthy subjects were suspended in RPMI-1640 culture medium supplemented with 10% human sera. The suspension was distributed in each well of a 96-well culture plate with a round bottom in a concentration of  $2.5 \times 10^5$  cells/ $200 \mu\text{l}$ . The multi-epitope peptide represented by SEQ NO: 1, either Cry j 1 or Cry j 2, was added to each well to a final concentration of 0.001 to  $20 \mu\text{g/ml}$  of the multi-epitope peptide,  $50 \mu\text{g/ml}$  of Cry j 1 or  $2 \mu\text{g/ml}$  of Cry j 2. The plate was incubated for 6 days. After  $0.5 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] thymidine was added to the medium, incubation was continued for a further 16 hours. After the cells were harvested on a glass filter using a cell harvester, the level of [ $^3\text{H}$ ] thymidine taken up into the cells

was determined using a liquid scintillation counter.

The peripheral lymphocytes from five out of the six patients showed proliferation response to the multi-epitope peptide. The peripheral lymphocytes from one patient and two healthy subjects  
5 showed no proliferation response (Fig. 10).

The proliferation response of peripheral lymphocytes began to occur with stimulation of  $0.1 \mu\text{g/ml}$  of the multi-epitope peptide and increased dose-dependently. Based on the results, the concentration of the multi-epitope peptide required for inducing  
10 T cell proliferation response in vitro is at least  $10 \mu\text{g/ml}$ .

Peripheral lymphocytes from 17 patients with cedar pollinosis and two healthy subjects were stimulated by  $10 \mu\text{g/ml}$  of the multi-epitope peptide to evaluate T cell response. No response to T cell proliferation was observed with the peripheral lymphocytes  
15 from the healthy subjects. In the 17 patients, a maximum [ $^3\text{H}$ ] thymidine uptake of 9,652 cpm was observed. When [ $^3\text{H}$ ] thymidine uptake of peripheral lymphocytes without antigen stimulation is regarded as 1, the uptake of [ $^3\text{H}$ ] thymidine by peripheral lymphocytes in the presence of an antigen is expressed by a stimulation index (SI).  
20 The results are shown in Fig. 11. Upon identification of T cell epitopes,  $\text{SI} > 2$  is regarded to be positive. Similarly,  $\text{SI} > 2$  is judged to be proliferation responsive to the peptide. Under this criterion, the proliferation response was noted in 13 out of the 17 patients (76.5%). From the results, the peptide-based  
25 immunotherapy is effective when administered to 76.5% of the cedar

pollinosis patients.

When patients with cedar pollinosis are subjected to the peptide-based immunotherapy using the multi-epitope peptide of the present invention, the proliferation response capability of peripheral lymphocytes from the patients to the multi-epitope peptide can be tested in advance so that the patients responsive to proliferation can be selected. Such a test enables determining if the peptide-based immunotherapy using the multi-epitope peptide is applicable to the individual patient. Therapeutic effects can also be predicted to a certain extent, based on the level of proliferation response.

#### Example 10

##### Inducing immune tolerance by administering cedar pollen allergen to mice

The detailed mechanism in hyposensitization therapy by which cedar pollen allergen is administered for the treatment is yet unknown. To clarify this mechanism, tests were conducted using mice. Cedar pollen allergen Cry j 1 was subcutaneously administered twice to five CBF1 female mice at intervals of 5 days in a dose of 300  $\mu$ g/mouse. For control, the same dose of PBS was subcutaneously given to five other female mice. Five days later, the animals were sensitized by subcutaneous injection of 100  $\mu$ g Cry j 1 together with Alum adjuvant. Ten days later, the lymphocytes were isolated to pool them as the lymphocytes from the control group and as the lymphocytes from the Cry j 1-administered mice. Cry j 1 was added to the pooled lymphocytes in doses of 0, 50 and 150  $\mu$ g/ml. Incubation was performed for 3 days

to collect the culture supernatant. IL-2 contained in the supernatant was measured with a device manufactured by Endogen Inc. The results are shown in Fig. 12. In the control (PBS-administered) mouse group, IL-2 production increased as the concentration of Cry j 1 increased from 0 to 50 and 150  $\mu$ g/ml. In contrast, in the Cry j 1- administered mouse group, IL-2 production was obviously reduced, as compared to the control group, indicating that immune tolerance was acquired by administration of the cedar pollen allergen. The results verify that currently implemented hyposensitization therapy using the cedar pollen allergen is efficacious.

#### Example 11

##### Identifying T cell epitopes in CBF1 mice

Eight-week-old male CBF1 mice were boosted (i.p.) three times with 10  $\mu$ g of recombinant Cry j 2 (rCry j 2) at intervals of two weeks together with an adjuvant (Imject Alum, manufactured by Pierce Inc.). One week after the final booster, the spleen cells were collected from three mice and mixed together. The spleen cells ( $5 \times 10^6$  cells) were cultured together with each of the 74 kinds of Cry j 2 overlapping peptides (0.115  $\mu$ M) consisting of 15 residues in 0.2 ml RPMI medium (supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml streptomycin) in each well of a 96-well plate (manufactured by Falcon Inc.). For control, the reactivities with PBS, 50  $\mu$ g/ml of Cry j 1, and 0.3  $\mu$ g/ml of rCry j 2 were also observed. Each reagent was distributed in three wells and incubated at 37°C for 3 days in 5% CO<sub>2</sub>. For the last 6 hours, pulse labeling

was performed with  $0.5\mu\text{Ci/well}$  of [ $^3\text{H}$ ] thymidine. The cells were collected on a glass filter using a cell harvester (Inoteck, Bertold Japan Co., Ltd.). After drying, the level of [ $^3\text{H}$ ] thymidine taken up into the cells was determined using a liquid scintillation counter  
5 (TRI-CARB 4530, Packard Japan KK).

CBF1 mice immunized with rCry j 2 showed a strong reactivity with its antigen rCry j 2 but did not react with Cry j 1 which is another major cedar pollen allergen. This proved that the reaction is antigen-specific. Among the 74 overlapping peptides tested, CBF1  
10 mice immunized with rCry j 2 showed marked response to Peptide Nos. 14 and 48 as shown in Fig. 2. These results indicate that Peptide Nos. 14 and 48 participate in antigen presentation as the major T cell epitopes in CBF1 mice. Peptides No. 14 and 48 are also known to be major T cell epitope peptides in humans. Therefore, CBF1 mice  
15 can be a useful animal model for judging the effectiveness of peptides used for the peptide-based immunotherapy against cedar pollen.

#### Example 12

##### Immune response of antigenic Peptide No. 14 in vivo

A solution of Peptide No. 14 (3 mg) in physiological saline  
20 was subcutaneously injected into each 8-week-old male CBF1 mouse (8 animals/group) twice, once and then again after a 5-day interval. For control, an equal volume ( $100\mu\text{l}$ ) of physiological saline was given to the control group in the same manner. On Day 5 after the second administration of the peptide, all mice were sensitized by  
25 subcutaneous injection with  $50\mu\text{g/mouse}$  of rCry j 2, together with



Imject Alum. One week after the sensitization, the spleen cells were collected from each mouse. The spleen cells ( $5 \times 10^6$  cells) were cultured together with  $3 \mu\text{g/ml}$  of rCry j 2 in 0.2 ml RPMI medium (supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin and  $50 \mu\text{g/ml}$  streptomycin) in each well of a 96-well plate (manufactured by Falcon Inc.). An incubation was also performed under the same conditions without rCry j 2 for comparison. T cell proliferation was determined in the same manner as in Example 1 using [ $^3\text{H}$ ] thymidine.

Cytokine was determined using the culture supernatant obtained by stimulating the three peptide-administered groups (0.3, 1.3, and  $10 \mu\text{g/ml}$ ) and the control group with  $0.3 \mu\text{g/ml}$  of Cry j 2 in vitro.

When CBF1 mice were previously subcutaneously administered Peptide No. 14, T cell immune response to the subsequent antigen stimulation by rCry j 2 was suppressed significantly ( $p < 0.01$ ), as compared to the physiological saline group (Fig. 13). The peptide-administered group showed a significant decrease in IL-2 production as compared to the control group. These results reveal that in the mouse model system, Peptide No. 14 exhibits the preventive effect for cedar pollinosis in the peptide-based immunotherapy.

#### 20 Example 13

##### Immune response of antigenic Peptide No. 48 in vivo

A solution of Peptide No. 48 (3 mg) in physiological saline was subcutaneously injected into each 6-week-old male CBF1 mouse twice at intervals of 5 days. For control, an equal volume ( $200 \mu\text{l}$ ) of physiological saline was given in the same manner. There were

eight animals each in the peptide-administered group and in the control group. On Day 5 after the second administration of the peptide, all mice were sensitized by subcutaneous injection with 50  $\mu$ g/mouse of rCry j 2 mixed with an adjuvant (Imject Alum). One week after  
5 the sensitization, the spleen cells were collected from each mouse. The spleen cells ( $5 \times 10^6$  cells) were cultured together with 3  $\mu$ g/ml of rCry j 2 in 0.2 ml RPMI medium (supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/ml streptomycin) in each well of a 96-well plate (manufactured by Falcon Inc.). An incubation  
10 was also performed under the same conditions without rCry j 2 for comparison. T cell proliferation was determined in the same manner as in Example 1 using [ $^3$ H] thymidine.

When CBF1 mice were previously subcutaneously administered Peptide No. 48, T cell immune response to the subsequent antigen  
15 stimulation by rCry j 2 was suppressed significantly ( $p < 0.05$ ), as compared to the physiological saline-administered group. This result indicates that in the mouse model system, Peptide No. 48 exhibits the preventive effect for cedar pollinosis in peptide-based immunotherapy (Fig. 14).

20 The experimental results described above reveal that the conventionally implemented hyposensitization therapy in humans using the cedar pollen extract works on the mechanism mediated by the T cell epitope.

#### Example 14

#### Determination of core sequence

To determine the minimum amino acid sequence (core) of the Cry j 1 peptide No. 22 (p106-120) necessary for the T cell line and T cell clone proliferation response, one amino acid residue each was deleted from the N and C terminals of this peptide as shown in Fig. 15 to prepare eleven peptides, i.e., p107-120 (p22-2), p108-120 (p22-3), p109-120 (p22-4), p110-120 (p22-5), p111-120 (p22-6), p106-119 (p22-7), p106-118 (p22-8), p106-117 (p22-9), p106-116 (p22-10), and p106-115 (p22-11) using a peptide synthesizer (PSSM-8, manufactured by Shimadzu Seisakusho Ltd.). The T cell lines (PJ, PR, PB) derived from three patients with cedar pollinosis and which react with Cry j 1 Peptide No. 22, p106-120, and the T cell clones (PB 8-3, PB 8-2, PB 9-39) from one of the patients were examined for the reactivity with these 11 peptides in the same manner as in Examples 1 and 2. Two T cell lines (PJ, PB) and two T cell clones (PB 8-2, PB 9-39) recognized p106-120 (p22-1) and proliferated, but one T cell line and T cell clone did not show any proliferation response (Fig. 15). The results reveal that the p106-120 core sequence consists of nine residues of "FIKRVSNVI" (the nine residues are designated as Cry j 1 #22 core).

#### Example 15

#### Multi-epitope peptide containing T cell epitopes derived from cedar pollen and hinoki pollen allergens

Two peptides (Cha o 1 #8-Cry j 1 #22 core, Cha o 1 #32-Cry j 1 #22 core) were synthesized by joining Peptide No. 8 (p71-90:

IFSKNLNLIKLNMPYIAGNK), which is a T cell epitope of *hinoki* pollen allergen Cha o 1 (Japanese Patent Application No. Hei 8-153527), or Peptide No. 32 (p311-330: SSGKNEGTNIYNNNEAFKVE) to Cry j 1 #22 core sequence "FIKRVSNI" obtained in Example 14 using a peptide synthesizer (PSSM-8, Shimadzu Seisakusho Ltd.). An RR sequence was inserted between Cha o 1 #8 and Cry j 1 #22 core and between Cha o 1 #32 and Cry j 1 #22 core, that is, Cha o 1 #8 - Cry j 1 #22 core (SEQ NO: 4) and Cha o 1 #32 - Cry j 1 #22 core (SEQ NO: 5).

A Cry j 1-specific T cell line and a Cha o 1-specific T cell line were prepared from the patients with cedar pollinosis and *hinoki* pollinosis, respectively. The Cry j 1-specific T cell line and Cha o 1-specific T cell line react with neither the tubercle bacillus antigen (PPD) nor the hemolytic streptococcus cell wall (SCW) antigen. The Cry j 1-specific T cell line reacts with Cry j 1 #22 or Cry j 1 #22 core but does not react with Cha o 1 #8 or with Cha o 1 #32.

The Cha o 1-specific T cell line reacts with Cha o 1 # 8 and #32 but does not react with Cry j 1 #22 or Cry j 1 #22 core (Fig. 16). However, these T cell lines all react with the multi-epitope peptide of SEQ NO: 4 and with the multi-epitope peptide of SEQ NO: 5. These results reveal that the multi-epitope peptides prepared by joining T cell epitopes derived from cedar pollen and *hinoki* pollen allergens are effective for peptide-based immunotherapy of patients with cedar pollinosis and with *hinoki* pollinosis.

#### Example 16

The proliferation response and the cytokine production which result

from addition of the peptides

Two clones, PJ7-9 and PB10-18, were employed to see if the activity of T cells can be altered by substituting the amino acids of T cell epitope peptide of the Cry j 1 #22 core. T cell clones PJ 7-9 and PB10-12 which react with Cry j 1 Peptide No. 22 p106-120 are restricted by DRB5\*0101 and recognize the nine residues of the Cry j 1 #22 core. Each of the nine amino acid residues in the peptide p108-120 (VFIKRVSNNVHIG) of 13 residues including the nine residues were substituted with an homologous amino acid and a non-homologous amino acid to produce analog peptides (Figs. 17 and 18). The reactivity of T cell clones PJ 7-9 and PB 10-18 with these analog peptides was examined in terms of the uptake of [<sup>3</sup>H] thymidine. The concentration of cytokine in the reaction solution was measured using a cytokine assay kit manufactured by R & D Systems. The results are shown in Figs. 17 and 18. The production of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-2, and IL-5 in the supernatant and the uptake of [<sup>3</sup>H] thymidine obtained by reacting the peptide of 13 residues with no amino acid substitution were regarded as 100%. In the PJ7-9 clone, the uptake of [<sup>3</sup>H] thymidine and cytokine production were both markedly suppressed by substituting amino acid Nos. 3, 4 and 6 in Cry j 1 #22 core "FIKRVSNNVI," namely, "K," "R," and "S," with both homologous and non-homologous amino acids or with only non-homologous amino acids (Fig. 17). Accordingly, the amino acids located in these positions are considered to be important for forming the complex of HLA and T cell receptor molecules via the peptide. Even though the first amino acid (F) is substituted with

its homologous amino acid Y, no change is noted in the uptake of  
[<sup>3</sup>H] thymidine and production of IL-4 and IL-5, but substitution  
with a non-homologous amino acid "S" results in a marked increase  
in IFN- $\gamma$  and IL-2 production, even though no change is observed in  
5 the uptake of [<sup>3</sup>H] thymidine. For the PB 10-18 clone, the uptake  
of [<sup>3</sup>H] thymidine is suppressed by substitution of amino acid No.  
1, 2, 3, 4, 6, 7, or 8 of Cry j 1 #22 core. The amino acids located  
in these positions are considered to be important for forming the  
complex of HLA and T cell receptor molecules via the peptide. It  
10 is further observed that the IL-2 production is suppressed by  
substitution of amino acid No. 6, 7, or 8, as compared to IL-5 production  
(Fig. 18). These results reveal that "SIKRVSNVI" obtained by  
substituting the first amino acid F with S in Cry j 1 #22 core increases  
the production of IFN- $\gamma$  and is thus effective as a therapeutic agent  
15 for allergy.

#### Industrial Applicability

The multi-epitope peptide of the present invention contains  
T cell epitopes derived from distinct allergen molecules. It contains  
the peptide presented on the HLA class II molecule encoded by the  
20 gene that frequently appears in the population of patients with allergy.

It further contains several peptides presented on the HLA class  
II molecules in different loci (DR, DQ, DP). A peptide-based  
immunotherapy for effectively treating a wider range of patients  
could be realized using a multi-epitope peptide of a minimum length.

25 When patients with allergy are subjected to the peptide-based

immunotherapy using the multi-epitope peptide of the present invention, the proliferation response of peripheral lymphocytes from the patients to the peptide can be tested prior to the therapy, to thereby select patients who produce the proliferation response. This test enables  
5 judging if the peptide-based immunotherapy with the multi-epitope peptide applies to the patients. The therapeutic effect is also predictable to a certain extent based on the level of the proliferation response.

Sequence Listing

SEQ ID NO:1

SEQUENCE LENGTH: 80

5 SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULAR TYPE: peptide

SEQUENCE DESCRIPTION:

	MKVTVAFNQF	GPNRRVFIKR	VSNVIIHGRR	IDIFASKNFH	40
10	LQKNTIGTGR	RISLKLTSBK	IASRRVDGII	AAYQNPASWK	80

SEQ ID NO:2

SEQUENCE LENGTH: 105

SEQUENCE TYPE: amino acid

15 TOPOLOGY: linear

MOLECULAR TYPE: peptide

SEQUENCE DESCRIPTION:

	MKVTVAFNQF	GPNRRVFIKR	VSNVIIHGRR	IDIFASKNFH	40
	LQKNTIGTGR	RWKNNRIWLQ	FAKLTGFTLM	GRRLKMPMYI	80
20	AGYKTFDGRR	VDGIIAAYQN	PASWK		105

SEQ ID NO:3

SEQUENCE LENGTH: 134

SEQUENCE TYPE: amino acid

25 TOPOLOGY: linear



MOLECULAR TYPE: peptide

SEQUENCE DESCRIPTION:

	MKVTVAFNQF	GPNNRRVFIKR	VSNVIIHGRR	IDIFASKNFH	40
	LQKNTIGTGR	RWKNNRIWLQ	FAKLTGFTLM	GRRPLWIIFS	80
5	GNMNIKLKMP	MYIAGYKTFD	GRRAEVSIVH	VNGAKFIRRV	120
	DGIIAAYQNP	ASWK			134

SEQ ID NO:4

SEQUENCE LENGTH: 31

10 SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULAR TYPE: peptide

SEQUENCE DESCRIPTION:

	IFSKNLNIKL	NMPLYIAGNK	RRFIKRVSNV	I	31
--	------------	------------	------------	---	----

15

SEQ ID NO:5

SEQUENCE LENGTH: 31

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

20 MOLECULAR TYPE: peptide

SEQUENCE DESCRIPTION:

	SSGKNEGJNI	YNNNEAFKVE	RRFIKRVSNV	I	31
--	------------	------------	------------	---	----

25

CLAIMS

1. A peptide-based immunotherapeutic agent comprising an effective amount of a multi-epitope peptide which is a linear polypeptide molecule comprising different T cell epitope regions joined to each other, wherein

(1) each of said T cell epitope regions shows a positivity index of not less than approximately 100 when measured in a population of patients sensitive to allergen(s);

10 (2) said multi-epitope peptide reacts with peripheral lymphocytes from at least not less than 70% of said population of patients sensitive to said allergen(s); and

(3) said multi-epitope peptide does not substantially react with IgE antibodies of the population of patients sensitive to said allergen(s).

2. The peptide-based immunotherapeutic agent of claim 1, wherein said different T cell epitope regions are derived from two or more different allergen molecules.

3. The peptide-based immunotherapeutic agent of claim 2, wherein said different allergen molecules are cedar pollen allergens Cry j 1 and Cry j 2.

4. The peptide-based immunotherapeutic agent of claim 1, wherein a site that is processed in the antigen-presenting cells is inserted between each of the T cell epitope regions.

25 5. The peptide-based immunotherapeutic agent of claim 4, wherein

said site that is processed in the antigen-presenting cells is an arginine dimer or a lysine dimer.

6. The peptide-based immunotherapeutic agent of claim 3, wherein said peptide contains an amino acid sequence described in any of  
5 SEQ NO: 1, SEQ NO:2, or SEQ NO:3.

7. The peptide-based immunotherapeutic agent of claim 3, wherein said peptide contains an epitope restricted by at least one HLA class II molecule selected from DRB5\*0101, DRB4\*0101, DQA1\*0102 - DQB1\*0602, DPA1\*0101 - DPB1\*0501, and DPA1\*0101 - DPB1\*0201.

10 8. The peptide-based immunotherapeutic agent of claim 2, wherein said different allergen molecules are cedar pollen allergen Cry j 1 and *hinoki* pollen allergen Cha o 1.

9. The peptide-based immunotherapeutic agent of claim 8, wherein said peptide contains an amino acid sequence of SEQ NO: 4 or SEQ  
15 NO: 5.

ABSTRACT

The present invention provides a monomolecular multi-epitope peptide prepared by binding T cell epitope regions derived from  
5 different allergen molecules with each other. A peptide-based immunotherapeutic agent containing an effective amount of the multi-epitope peptide can prevent and treat a wide range of allergic diseases.

